

# **Hämorrhagische Zystitis und BK-Virus-Infektion nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei Kindern**

---

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Loreen Maier  
geboren am 05. August 1983  
in Bad Langensalza

Gutachter:

1: .....

2: .....

3: .....

Tag der öffentlichen Verteidigung:.....

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
aGVHD	akute Graft-versus-Host-Erkrankung
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATG	Antithymozytenglobulin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BKV	BK-Virus, BK-Viren
bp	Basenpaare
BU	Busulfan
C	Cytosin
Cl	Chlorid
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus
CD	Cluster of Differentiation
cGVHD	chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
CMV	Zytomegalie-Virus
CsA	Cyclosporin A
CY	Cyclophosphamid
d	day/Tag
dNTP	Desoxynukleotriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DUN 1	Sense-Primer
DUN 2	Antisense-Primer
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Early Structure Region
FamI	identischer Familienspender
FI	identischer Fremdspender
FNI	nicht identischer Fremdspender

g	Guanin
GVHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
GVL	Graft-versus-Leukemia
Gy	Gray
HC	hämorrhagische Zystitis
HCl	Salzsäure
HHV 6	Humanes-Herpes-Virus 6
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSV 1	Herpes-Simplex-Virus 1
HSV 2	Herpes-Simplex-Virus 2
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
INF	Interferon
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
l	Liter
LSR	Late Strukture Region
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
m	milli
M	Molekulargewichtsstandard
Max	Maximum
Min	Minimum
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
MTX	Methotrexat
n	Anzahl
nm	Nanometer
NCCR	Noncoding Control Region
n.s.	nicht signifikant
OR	Odds Ratio

p	Wahrscheinlichkeit
PBSZ	periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
PTLD	lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
PVAN	Polyomavirus-assoziierte Nephropathie
Q-PCR	Quantitative Light Cycler® PCR
SD	Standardabweichung
SV40	Simian-Virus 40
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borsäure- Ethylendiamintetraessigsäure
TBI	totale Ganzkörperbestrahlung
TE	Tris-EDTA
TMP	Trimethoprim
TNF	Tumornekrose Faktor
TREC	T-Zell-Rezeptor Exzisions Zyklus
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleich
VZV	Varicella-Zoster-Virus
WHO	World Health Organisation
$\lambda$	lambda
$\mu$	mikro

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Geschichtlicher Hintergrund	3
2.2 Grundlagen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	4
2.3 Komplikationen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	8
2.3.1 Infektionen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	10
2.3.1.1 BK-Virus-Infektion	11
2.3.1.2 Methoden zum BK-Virus-Nachweis	12
2.3.2 Hämorrhagische Zystitis	13
<b>3 Ziele der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>4 Patienten, Methoden und Material</b>	<b>16</b>
4.1 Patienten	16
4.1.1 Patientencharakteristik	16
4.1.2 Konditionierungscharakteristik	18
4.1.3 Transplantationscharakteristik	19
4.2 Methoden	23
4.2.1 Klinische Proben und Bestimmung des Grades der HC	23
4.2.2 DNA-Extraktion aus Blut- und Urinproben	23
4.2.3 Qualitative PCR zum Nachweis von BKV	24
4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese der viralen DNA	25
4.2.5 Umgang mit den Proben	27
4.2.6 Quantitativer BKV-Nachweis mittels Light Cycler®	27
4.2.7 Berechnung der Viruslast	29
4.3 Materialien	29
4.3.1 Reagenzien	29
4.3.2 Geräte und Hilfsmittel	30
4.4 Statistische Methoden	31

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
5.1	Qualitativer Nachweis des BKV bei allen transplantierten Kindern vor und nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation	32
5.2	Diagnose der hämorrhagischen Zystitis und Schweregrade	34
5.2.1	Zeitlicher Verlauf der HC	35
5.2.2	Konditionierung, Transplantation und klinischer Verlauf der HC	36
5.3	BKV und hämorrhagische Zystitis	39
5.4	Quantitativer Nachweis des BKV	40
5.4.1	BK-Viruslast im Urin und im Blut mit HC und deren Schweregrade	40
5.4.1.1	Viruslast, HC, Geschlecht und Alter	43
5.4.1.2	Viruslast, HC und Konditionierungsregime	45
5.4.1.3	Viruslast, HC, Stammzellquellen und Transplantationsart	48
5.4.1.4	Viruslast, HC und klinischer Verlauf	49
5.4.2	Grenzwertanalyse	50
5.5	Risikofaktoranalyse	51
5.6	Patientenverläufe	53
5.6.1	Kasuistik Patient 355	53
5.6.2	Kasuistik Patient 451	55
5.6.3	Kasuistik Patient 403	56
5.6.4	Kasuistik Patient 442	57
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
6.1	Inhaltliche Diskussion	58
6.1.1	BKV-Häufigkeitsverteilungen	58
6.1.2	Hämorrhagische Zystitis	60
6.1.3	Zusammenhang von BKV und HC	61
6.1.3.1	Geschlecht und Alter	64
6.1.3.2	Konditionierung	66
6.1.3.3	Transplantationsart	68
6.1.3.4	Klinischer Verlauf	69
6.2	Methodische Diskussion	71

<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>87</b>
9.1	Tabellenverzeichnis	87
9.2	Abbildungsverzeichnis	88
9.3	Tabellarischer Lebenslauf	89
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	90
9.5	Danksagung	91



## 1 Zusammenfassung

Die hämorrhagische Zystitis (HC) ist eine schwerwiegende Komplikation nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT). Die Pathogenese der HC ist nicht vollständig geklärt. Für Erwachsene wird ein multifaktorieller Prozess aus Virusinfektion, Transplantationsart, Konditionierungsregime und der Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) angenommen. Über die Entstehung der HC bei Kindern, speziell die Assoziation mit BKViren (BKV) ist sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden 147 am Universitätsklinikum Jena transplantierte Kinder (medianes Alter: 12 Jahre; 57 Mädchen, 90 Jungen) in Bezug auf die Inzidenz, die Risikofaktoren und die BKV-Assoziation der HC von 1/2000 bis 12/2006 retrospektiv analysiert. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die BKV-Quantifizierung mit dem Light Cycler® gelegt.

Signifikante Häufigkeitsverteilungen wurden mit dem Chi<sup>2</sup>-Test getestet. Mittels univariater und multivariater binär logistischer Regressionsanalyse wurde die Odds Ratio (OR) bestimmt. In die Risikofaktoranalyse wurden Patientenalter, Geschlecht, Grunderkrankung, Gabe von Cyclophosphamid (CY), von Busulfan (BU), von BU/CY, Ganzkörperbestrahlung (TBI), Verabreichung von Antithymozytenglobulin (ATG), Stammzellen eines Fremdspenders und BKV im Urin erstmalig vor Transplantation eingeschlossen. Die BKV wurden mit qualitativer und quantitativer PCR nachgewiesen. Der quantitative Nachweis der BKV erfolgte mit dem Light Cycler®. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den Viruslasten dargestellt.  $1 \times 10^7$  Kopien/ml im Urin wurden als Grenzwert angenommen. Mittels ROC-Analyse wurde dieser Cut-Off verifiziert. Für einzelne Patienten wurden individuelle Viruslastprofile erstellt.

19 von 147 Kinder (12,9%) erkrankten an einer HC, im Median 33 Tage nach HSZT (Bereich: 1 Tag – 98 Tage). Die HC dauerte im Median 35 Tage (Bereich: 5 Tage – 109 Tage). Die schwere HC war häufiger, als die moderate HC. Frequentiell häufiger erkrankten Patienten mit einer akuten Graft-versus-Host-Erkrankung (aGVHD) an einer HC. Signifikante Risikofaktoren waren Patientenalter  $>12$  Jahre ( $OR = 3,275$ ;  $p = 0,031$ ), Verwendung von BU ( $OR = 3,514$ ;  $p = 0,013$ ), Kombination von BU/CY ( $OR = 4,935$ ;  $p = 0,002$ ) und Verwendung von Stammzellen eines Fremdspenders ( $OR = 3,309$ ,  $p = 0,043$ ). Signifikante unabhängige Risikofaktoren waren Patientenalter  $>12$  Jahre und die Kombination aus BU/CY. Des Weiteren wurde die BKV-Assoziation analysiert. Alle 19 HC-Patienten schieden BKV im Urin nach HSZT aus. Bei 14 von 19 HC-Patienten (73,7%) konnte BKV im Urin zum Zeitpunkt der HC nachgewiesen werden. BKV im Blut wurden für die Patienten mit HC

signifikant häufiger nachgewiesen ( $p < 0,001$ ). Die BK-Viruslasten im Urin der Patienten mit HC waren signifikant höher als die der Patienten ohne HC ( $p < 0,0001$ ). Signifikant höhere Viruslasten im Urin schieden die Patienten, welche ATG erhielten ( $p = 0,01$ ) und Patienten über 12 Jahre ( $p = 0,009$ ) aus. Eine Viruslast von  $1 \times 10^7$  Kopien/ml wurde als Grenzwert angenommen. Signifikant mehr HC-Patienten erreichten bzw. überschritten diesen Grenzwert ( $p = 0,001$ ). Die Sensitivität betrug 93%. Die Spezifität erreichte 59%. Die individuellen BK-Viruslastprofile der Kinder zeigten einen Anstieg vor HC-Beginn.

Die vorliegende Promotion konnte nachweisen, dass es sich bei der Pathogenese der HC im Kindesalter um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Die Risikofaktoren an einer HC zu erkranken sind: Alter über 12 Jahre, allogene Transplantation mit Stammzellen eines Fremdspenders, Gabe von Busulfan und BU/CY. BU/CY als wichtigster Risikofaktor lässt auf eine Potenzierung der Blasentoxizität der Chemotherapeutika durch deren Kombination schließen. Viruslasten über  $10^7$  Kopien/ml führten zu einer HC. Die Viruslasten stiegen ebenfalls bei Patienten mit ATG-Gabe und einem Alter über 12 Jahren. Die individuellen Viruslastprofile zeigten eindeutig einen Anstieg der Viruslasten zu Beginn der HC. Es kann davon ausgegangen werden, dass unter Betrachtung der beschriebenen Risikofaktoren eine schnelle, aber kostenaufwendige Quantifizierung der BKV mit dem Light Cycler® sinnvoll ist. Ein Anstieg der Viruslasten kann eindeutige Hinweise auf die mögliche Entstehung der HC geben. Die Viruslastbestimmung im Urin könnte so vor allem in den ersten vier Wochen nach HSZT im klinischen Alltag relevante Zusatzinformationen liefern. Dies ist besonders im Hinblick auf die frühzeitige Behandlung von Bedeutung. Therapieerfolge oder ein Abklingen der Infektion lassen sich ebenfalls möglicherweise mit einer Quantifizierung verfolgen.

## **2 Einleitung**

Als noch junge Methode der Medizin gewinnt die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) immer mehr an Bedeutung in der Behandlung von hämatologischen, onkologischen, immunologischen und genetischen Erkrankungen (Zintl et al. 1991, Zintl 1988b, Down et al. 1991). Für viele dieser Erkrankungen stellt die HSZT die einzige Therapieoption dar (Eyrich et al. 2003). Die Probleme der Stammzelltransplantation ergeben sich vor allem aus den Abstoßungsreaktionen, der Toxizität der Konditionierung und den Infektionen unter Therapie. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der hämorrhagischen Zystitis (HC) im Kindesalter nach Transplantationen von hämatopoetischen Stammzellen, welche an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Jena von 2000 bis 2006 durchgeführt wurden. Die Ursachen der HC sind nicht vollständig geklärt. Angenommen wird ein multifaktorieller Prozess, welcher sich aus dem Konditionierungsregime, der Transplantationsart und Infektionen durch BK-Viren (BKV) zusammensetzt (Leung et al. 2005a). Die nachfolgenden Abschnitte der Arbeit sollen zum Verständnis der Grundlagen der HSZT und deren Komplikationen dienen. Insbesondere soll auf die Infektionen nach HSZT, vor allem aber auf die Infektion durch BKV und die HC eingegangen werden.

### **2.1 Geschichtlicher Hintergrund**

Alle bisherigen Erkenntnisse der Transplantation von Knochenmark und peripheren Blutstammzellen (PBSZ) beruhen auf Forschungsergebnissen aus dem späten 20. und dem 21. Jahrhundert (Thomas und Blume 1999). Nach den atomaren Angriffen im 2. Weltkrieg bemerkte man erstmalig, dass radioaktive Strahlung einen nachhaltigen Effekt auf das Knochenmark hat, indem es seine Fähigkeit zur Produktion von hämatopoetischen Zellreihen stark einschränkt bzw. verhindert. (Thomas und Blume 1999). Die Möglichkeit, Knochenmark zu transplantieren, wurde in den 50er Jahren erstmalig durch Jacobson und Lorenz in Form von Tierexperimenten in Erwägung gezogen. Mäusen wurden nach einer tödlichen Strahlendosis intravenös Knochenmarkzellen oder Milzzellen verabreicht. Die Mäuse wurden somit geheilt (Lorenz et al. 1951, Jacobson et al. 1950). 1959 setzten Mannik und seine Mitarbeiter Hunde einer supraletalen Ganzkörperbestrahlung aus und transplantierten ihnen danach eigenes Knochenmark. Die autologe Knochenmarktransplantation glückte (Mannik et al. 1960). Man versuchte, die erlangten Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen. Mathé und Mitarbeitern gelang die erste

allogene Transplantation. Allerdings verstarb der Patient wahrscheinlich an den Folgen der Graft-versus-Host-Krankheit (GVHD) (Mathé et al. 1965). Es folgten Jahre intensiver Forschung an allogener Transplantation von Knochenmark, vor allem durch Thomas und Mitarbeiter (Groth et al. 2000). Jedoch erlitt die junge Methode Rückschläge. Mit der Entdeckung des HLA-Systems und der ersten HLA-identischen Transplantation im Jahre 1968 begann eine neue, moderne Ära der Knochenmarktransplantation (Zintl 1988b, Thomas und Blume 1999, Groth et al. 2000, Storb 1984). Meilensteine in der Entwicklung der Stammzelltransplantation waren die Entdeckung der Transplantationsantigene und die Schaffung einer erfolgreichen Konditionierung mit Chemotherapie und Strahlentherapie. Die optimale Therapie und der Schutz des Patienten in der Zeit der Rekonstitution des Immunsystems und das Verständnis der Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) und deren Prophylaxe trugen ebenfalls dazu bei. Diese Erkenntnisse machten die Transplantation von Stammzellen im Laufe der Jahre klinisch erfolgreich (Zintl 1988b, Zintl 1988a).

## **2.2 Grundlagen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Unter hämatopoetischer Stammzelltransplantation versteht man die Übertragung von Knochenmark oder PBSZ von einem Spender auf einen Empfänger. Ziel ist das Anwachsen des Transplantats im Empfänger, die Übernahme der Hämatopoese, der dauerhafte Chimärismus und die gegenseitige Immuntoleranz von Empfänger und Transplantat (Kolb 2003).

Man unterscheidet drei Arten der HSZT. Die syngene, autologe und allogene Transplantation (Zintl 1988b). Die syngene Transplantation ist selten und beschreibt die Transplantation von Stammzellen, welche von einem identischen Zwillingsgeschwisterkind gespendet wurden. Als autologe Transplantation bezeichnet man die Reinfusion von körpereigenen hämatopoetischen Stammzellen. Voraussetzung für die autologe Transplantation ist die Gewinnung möglichst tumor- oder leukämiefreier Zellen in Remission vor der geplanten Transplantation. Da sowohl bei syngener als auch bei autologer Transplantation Spender- und Empfängermaterial identisch sind, muss nicht mit einer Abstoßungsreaktion gerechnet werden. Der antileukämische- bzw. antitumoröse Effekt der T-Zellen des Spenders fehlt allerdings (Ebell 2006, Kolb 2003). Als allogene Transplantation bezeichnet man die Transplantation immunologisch nicht identischer hämatopoetischer Stammzellen eines Fremdspenders (Zintl 1988a). Man unterscheidet hierbei HLA-identische Geschwisterspender, HLA-passende Familienspender und HLA-passende nichtverwandte Fremdspender (Ottinger et al. 2003). Der ideale allogene Spender ist ein identisches Geschwisterkind. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein

HLA-identisches Geschwisterkind vorliegt, beträgt 25%. Sollte kein Geschwisterkind als Spender in Frage kommen, wird eine unverwandte Fremdspendersuche über nationale und internationale Spenderzentralen eingeleitet. Mit 50 – 80% Wahrscheinlichkeit lässt sich ein geeigneter Spender finden. Die Suche nach einem passenden Familienspender, welcher kein Geschwisterkind ist, ist kosten- und zeitintensiv und macht nur in Ausnahmefällen Sinn. Die Wahrscheinlichkeit, einen identischen Familienspender (außer ein Geschwisterkind) zu finden, ist <10% (Ottinger et al. 1994). Im Gegensatz zur autologen und syngenon Transplantation muss mit einer GVHD gerechnet werden (Graf Finckenstein et al. 2002). Der Graft-versus-Leukemia-Effekt (GVL) wird bei der allogenen Transplantation ausgenutzt (Eibl et al. 1996).

Seit das Knochenmark nicht mehr als die alleinige Quelle der Stammzellen gilt, wurde der klassische Terminus der Knochenmarktransplantation durch den Oberbegriff der hämatopoetischen Stammzelltransplantation ersetzt. Zum heutigen Zeitpunkt werden Stammzellen aus drei verschiedenen Quellen verwendet. Knochenmark, periphere Blutstammzellen und Nabelschnurblut (Fu und Liesveld 2000, Broxmeyer et al. 1989, Eibl et al. 1996, Klein et al. 2001). Um hämatopoetische Stammzellen aus dem Blut nutzen zu können, müssen sie vorher aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Dies gelingt mit Hilfe von Wachstumsfaktoren. Hämatopoetische Stammzellen sind kleine mononukleäre Zellen. Die Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeiten aus, sich in alle Zelllinien der Hämatopoese differenzieren zu können, sich selbst zu replizieren und somit die Hämatopoese aufrecht zu halten (Fu und Liesveld 2000, Metcalf 2007a, Metcalf 2007b, Gordon 1993). Der Phänotyp der Stammzellen inkludiert die Expression von CD34-Antigenen. Die Quantifizierung von CD34<sup>+</sup> Zellen in Knochenmark oder PBSZ stellt sich als erfolgreich heraus. Ein Minimum von  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> Zellen je Kilogramm Körpergewicht des Empfängers sollten für eine erfolgreiche Therapie transplantiert werden. Eine höhere Dosis an CD34<sup>+</sup> Zellen im Transplantat verringert das Risiko eines Therapieversagens bei HLA-identischen Geschwistertransplantationen (Fu et al. 2002, Ringdén et al. 2003).

Genetisch determinierte Antigene der Zellmembranen, die eine Immunreaktion mit möglicher Abstoßung des Transplantats im Empfängerorganismus erzeugen können, sind Histokompatibilitätsantigene. Ein System der Histokompatibilitätsantigene ist das Human Leukocyte Antigene (HLA)-System (Jäger 1989). Unter dem HLA versteht man den menschlichen MHC-Komplex (Major Histocompatibilitykomplex). Das HLA-System teilt sich in 2 Klassen: MHC I (HLA I) und MHC II (HLA II). HLA I-Moleküle sind an der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen zu finden. HLA II-Moleküle hingegen nur auf den Oberflächen professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APC). Zu den APCs gehören dendritische Zellen, B-Zellen und aktivierte Makrophagen. HLA I-Moleküle bestehen an der Zelloberfläche aus einer  $\alpha$ -Polypeptidkette, die durch die HLA A-, B- und C-Gene auf dem Chromosom 6 kodiert werden und einer leichten Kette. Das  $\beta$ 2-Mikroglobulin ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert. Die HLA II-Moleküle bestehen an der Zelloberfläche aus zwei Polypeptidketten,  $\alpha$  und  $\beta$ , die jeweils durch die HLA DR-, DQ-, DP-Regionen auf dem Chromosom 6 verschlüsselt werden. Die Genloci sind eng miteinander verbunden und weisen jeweils eine große Anzahl von Allelen auf. Jeweils als Paar vorliegend, werden die Gene für das HLA-System haploidentisch vererbt. Jeweils 50% von Vater und Mutter werden nach den Mendelschen Regeln weitergegeben. Die Antigene verhalten sich autosomal kodominant und besitzen eine niedrige Rekombinationsfrequenz. Trotz der Komplexität des HLA-Systems können innerhalb einer Familie nur vier Haplotypen existieren. Mittels serologischen und molekularbiologischen Tests werden die Antigene nachgewiesen (Choo 2007).

Die MHC-Moleküle präsentieren dem T-Zell-Rezeptor Peptide. Eine T-Zelle nimmt dieses Peptid als Antigen wahr, sobald es als eine bestimmte allelische Variante an den MHC-Komplex gebunden ist. Man bezeichnet dies als MHC-Restriktion der T-Zellen. Das CD8-Corezeptormolekül der T-Zellen erkennt MHC I-Peptidkomplexe und wird durch die Bindung aktiviert. Die aktivierte CD8-Zelle erkennt Zellen, die zytosolische Pathogene präsentieren. B-Zellen und Makrophagen werden aktiviert, indem eine  $CD4^+$  T-Zelle mit einem MHC II-Peptid-Komplex interagiert. So erklärt sich die Reaktion von T-Zellen auf die MHC-Komplexe eines Transplantats und die Wichtigkeit der HLA-Identität bzw. der HLA-Kompatibilität zur Transplantation (Janeway et al. 2002).

Neben den HLA-Antigenen existieren noch weitere Transplantationsantigene. Die Minor-Histokompatibilitätsantigene werden auf Nicht-HLA-Genregionen verschlüsselt und sind Peptide intrazellulärer Proteine, die durch die HLA-Antigene präsentiert werden. Die Minor-Antigene sind vermutlich für die GVHD bei HLA-identischen Geschwisterspendern verantwortlich (Kolb 2003).

Die Konditionierung ist die Vorbereitung des Patienten auf die Transplantation. Fast alle Patienten sind trotz ihrer Grunderkrankung immunkompetent und zur Abstoßung des Transplantats in der Lage. Patienten mit schweren Immundefekten sind durch ihre Grunderkrankung bereits konditioniert und brauchen meist keine immunsuppressive Therapie vor HSZT (Thomas 1995). Transplantation auf Grund einer malignen Erkrankung bedarf neben der Immunsuppression intensiver sequentieller Chemo- und Radiotherapie.

Üblich ist die Kombination beider Konditionierungsschemata. Chemo- und Radiochemotherapie dienen der Transplantation zur Myeloablation und dem damit geschaffenem Raum zur gleichmäßigen Neuansiedlung des Transplantats. Die Konditionierung wirkt extrem zytostatisch und zerstörend auf das Immunsystem des Empfängers und eliminiert das maligne Gewebe. Die myeloablative Hochdosistherapie steht in engem Zusammenhang mit der Toxizität der Konditionierung. Studien zeigen, dass mit reduziertem Konditionierungsregime bei allogener Transplantation die Inzidenz von therapieassoziiierter Mortalität gesenkt werden kann. Hierbei wird der immunologische Effekt des Transplantats gegen das maligne Gewebe ausgenutzt. Trotz der reduzierten Konditionierung steigt die Tumorprogression nicht an (Valcárcel et al. 2005, Strahm et al. 2007, Kasper und Sayer 2006).

Als „Engraftment“ bezeichnet man das Anwachsen des Transplantats im Knochenmark des Empfängers, welches gekennzeichnet ist durch den Anstieg von Thrombozyten, Granulozyten und Retikulozyten. Allerdings besteht kurz nach Transplantation beim Empfänger des Transplantats eine schwere Neutropenie, welche die ersten Wochen bestehen bleibt.

Die Hämatopoese erholt sich nach ca. zwei Monaten bei erfolgreicher Transplantation. Das Immunsystem bedarf zur Rekonstitution ein bis zwei Jahre. In dieser Zeit ist der Patient einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt. Mit der Einschränkung der zellulären und humoralen Immunität gehen ein verstärktes Überwachen der Patienten und rechtzeitige antibiotische und antimykotische Absicherung einher. Nach HSZT kann eine Restimmunität allerdings vorhanden sein. So können B-Zellen des Spenders, welche mittransplantiert wurden, Antikörper gegen Antigene produzieren, gegen die der Spender immun war. Zu diesen gehören Tetanus, Diphtherie, Hepatitis und Polio (Kolb 2000, Thomas 1995, Avigan et al. 2001, Kolb 2003, Parkmann und Weinberg 1999).

Die Regeneration der T-Zellen nach Transplantation verläuft auf zwei Wegen. Der so genannte zentrale Weg ist thymusabhängig und setzt einen intakten Thymus voraus. T-Zellen, die den Thymus erst kürzlich verlassen haben, weisen auf die Erholung des Immunsystems

hin. Die Bestimmungen des T-Zell-Rezeptor Exzisions Zyklus (TREC) und unreifer T-Zellen mit dem Oberflächenantigen CD45RA eignen sich zur Darstellung. Der periphere Weg der T-Zell-Rekonstitution ist thymusunabhängig und sehr wichtig, da viele Konditionierungsregime den Thymus schädigen. Die Expansion maturer T-Lymphozyten, welche mit dem Transplantat übertragen werden, gewährleistet die Rekonstitution des Immunsystems. CD34<sup>+</sup> selektionierte Transplantationen weisen somit ein verspätetes Einsetzen der Rekonstitution des Immunsystems auf (Sutherland et al. 2008, Mitra et al. 2002, Rutella et al. 2001, Heining et al. 2007).

### **2.3 Komplikationen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Wichtige Komplikationen der HSZT entstehen durch die Toxizität der Chemotherapie. Die Zytostatikatherapie schädigt neben den malignen Zellen auch gesunde Zellen. Vor allem Zellen mit einer hohen Proliferationsrate sind betroffen. Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Allergien, Diarrhoen, Venenentzündungen, Herzrhythmusstörungen, Stomatitis, Alopezie und Amenorrhoe sind einige Folgen der Chemotherapie. Schwerwiegende unerwünschte und bleibende Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie sind Kardio-, Hepato-, Nephro- und Neurotoxizität (Kolb 2000, Aktories und Unger 2005, Uderzo et al. 2007). 15 - 40% der Patienten zeigen Atemwegs- und Lungenparenchymdefekte nach Stammzelltransplantation. Häufige Spätfolgen der Ganzkörperbestrahlung und des resultierendem Hypogonadismus sind Osteoporose und pathologische Frakturen. Durch Radiotherapie entstehen ebenfalls bleibende Schäden wie Infertilität, Zahnabnormalitäten und Katarakt. Das Größenwachstum und der Eintritt in die Pubertät von Kindern nach HSZT sind durch die verminderte, gestörte Funktion des endokrinen Systems eingeschränkt bzw. verhindert (Socié et al. 2003, Sanders 1990, Sanders 2008). Eine schwerwiegende Komplikation ist das Transplantatversagen. Als primäres „Graft Failure“ bezeichnet man die ausbleibende Etablierung der Hämatopoese des Spenders im Empfänger bis zum Tag 41 nach Transplantation. Das sekundäre Transplantatversagen ist gekennzeichnet durch den erneuten Abfall von neutrophilen Zellen, nachdem bereits ein Engraftment zu verzeichnen war. Die Ursachen für das fehlschlagende Anwachsen des Transplantats sind eine inadäquate Anzahl der transplantierten Stammzellen, unzureichende Konditionierung und folgende immunkompetente Abstoßung, HLA-inkompatible Transplantation, T-Zell-Depletion, multiple Transfusionen in der Anamnese und Infektionen mit Zytomegalie- und Herpesviren (Scheffold et al. 2004, Appelbaum 2003, Rank 2007).



Nach Behandlung eines fortgeschrittenen Stadiums einer malignen Erkrankung besteht ein erhöhtes Risiko an einem Rezidiv zu erkranken. Eine erneute Remission kann durch Chemotherapie selten erreicht werden. Einem Rezidiv bei allogener Transplantation geht vermutlich eine Immuntoleranz der Spenderzellen voraus. Mit Hilfe der Chimärismusanalyse lassen sich angestiegene autologe Zellen nachweisen. Immunologische Intervention mittels Transfusion von Spenderlymphozyten bietet in diesem Falle eine Möglichkeit in Remission zu gelangen (Beck et al. 2002). Eine weitere schwerwiegende Komplikation ist die Entstehung von malignen Zweiterkrankungen nach erfolgreicher Erstbehandlung (Adès et al. 2002).

Die GVHD ist eine der Hauptkomplikationen der HSZT (Kolb 2000). Rund 25% der Todesfälle nach HSZT sind ursächlich auf eine GVHD zurückzuführen. Die Entstehungsursache ist ein multifaktorieller Prozess, welcher in der Überproduktion von Interleukinen, Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Interferonen (INF) mündet. Verletzungen des Gewebes durch Chemotherapie, Infektionen, der Tumor selbst, erhöhte Produktion von HLA-Antigenen und auto- und alloreaktive T-Zellen sind Teile dieses Prozesses (Ferrara et al. 1999). Man unterscheidet eine akute GVHD (aGVHD) und eine chronische GVHD (cGVHD) voneinander, wobei die chronische Form 100 Tage nach Transplantation aus der akuten oder als de-novo GVHD entstehen kann.

Nach dem Seattle Schema werden die akute und chronische Form in Grade unterteilt. An Haut, Darm und Leber manifestiert sich die GVHD mittels Exanthenen und Blasen auf der Körperoberfläche, Diarrhoen, Ileus und angestiegenem Bilirubin. Für die aGVHD ergibt sich aus der Summe der Manifestationsorte und der Schwere der Manifestation eine Unterteilung von Grad 0 bis Grad IV. Um eine aGVHD zu vermeiden, können prophylaktische Maßnahmen eingeleitet werden. Zu diesen zählen die Gabe von Methotrexat (MTX), Cyclosporin A (CsA), Kortikosteroiden oder die Kombination aus diesen Medikamenten. Ein besonders hohes Risiko, eine aGVHD zu erleiden, besteht bei unverwandter Fremdspende und HLA-inkompatibler Spende. Eine zusätzliche Prophylaxe mittels T-Zell-Depletion durch Antithymozytenglobulin (ATG) mindert das Risiko an einer GVHD zu erkranken (Graf Finckenstein et al. 2002, Nash et al. 2000).

Bis zu 80% der Patienten mit aGVHD Grad II-IV erkranken folgend an einer cGVHD. Neben der aGVHD sind Transplantationen von Knochenmark ohne T-Zell-Depletion, Transplantation von einem weiblichen Spender für einen männlichen Empfänger und ein Empfängeralter über 20 Jahre Risikofaktoren an einer cGVHD zu erkranken (Ozawa et al.

2007). Die cGVHD tritt in den unterschiedlichen Graden als subklinisch, limited und extensive disease auf. Als Unterscheidungsmerkmal von der akuten Form dient die Autoimmunkomponente der cGVHD. Diese kann sich in Form von Sklerodermie, Alopezie, Konjunktivitis, Lichen planus, biliären Zirrhosen und Lungenerkrankungen äußern. Behandelt wird die cGVHD ebenfalls mittels Steroiden und Immunsuppressiva, wie CsA und Tacrolimus, aber auch durch monoklonale Antikörper, Plasmapherese, extranodale Bestrahlung, UVA-Bestrahlung und extrakorporale Photopherese (Atkinson et al. 1990, Ratanatharathorn et al. 2001).

### **2.3.1 Infektionen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation**

Infektiöse Komplikationen nach Stammzelltransplantation haben einen negativen Einfluss auf das Outcome der Transplantation. Infektionen steigern die Mortalität und Morbidität, besonders unter Verwendung von allogenem Fremdspendermaterial (Parody et al. 2006). In der neutropenischen Phase (neutrophile Granulozyten unter 500/ $\mu$ l) nach Transplantation bis zum Anwachsen des Transplantats ist der Patient besonders gefährdet, bakterielle Infektionen zu erleiden. Sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien verursachen eine Infektion. Die am häufigsten auftretende Infektion in der Pre-Engraftment-Phase ist die Infektion mit *E. coli*. Zu 75% sind gramnegative Keime Verursacher eines septischen Schocks nach HSZT bei Kindern. Neben Neutropenie und gestörter Schleimhautbarriere des Gastrointestinaltrakts sind Dauerkatheter verantwortlich für die Anfälligkeit. In dieser Zeit sind Superinfektionen mit Pilzen möglich. Bei den Pilzinfektionen stehen vor allem die Infektionen mit *Candida* und *Aspergillus* im Vordergrund. Durch die Einführung des Antimykotikum Fluconazol konnte vor allem der Candidainfektion entgegen gewirkt werden. Mit voranschreitendem Engraftment geht die Zunahme der viralen und Abnahme der bakteriellen Infektionen einher (Park et al. 2006, Avigan et al. 2001, McCann et al. 2004, Bindl und Nicolai 2005, Saavedra et al. 2002).

Infektionen nach Engraftment des Transplantats sind zurückzuführen sowohl auf eine GVHD und deren Behandlung mit Immunsuppressiva, als auch auf die noch inkomplette Rekonstitution des Immunsystems (van Kraaij et al. 2002). Viren sind in der Lage inflammatorische Prozesse und eine generelle T-Zellaktivierung zu induzieren. Virale Infektionen können zu einer tödlichen Pneumonitis und Multiorganversagen führen und bedürfen deswegen genauer Screeningkontrollen und prophylaktischer Behandlungen (Hebart et al. 2001, Hirsch 2005b).

Reaktivierungen und Neuinfektionen mit den Viren der Herpesgruppe sind besonders problematisch. Hierbei sind Infektionen der Mundschleimhaut oder des Genitaltraktes mit dem Herpes Simplex Virus (HSV1; HSV2), Herpes Zoster durch das Varizella-Zoster-Virus (VZV) und Enzephalitis durch das Humane-Herpes-Virus 6 (HHV6) inkludiert. Eine akute Zytomegalie-Virus-Infektion (CMV) verursacht unter anderem eine interstitielle Pneumonitis, Enteritiden mit Ulzerationen, Hepatitis, Thrombozytopenie und ein Mononucleosis-Like Syndrome, mit Fieber und Arthralgien. Das Epstein-Barr-Virus ist assoziiert mit lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation (PTLD) (Ambinder 1999, Arvin 1999, Burns 1999, Zaia 1999, Funk et al. 2007). Aber auch Adenovirusinfektionen sind häufig und steigern die Morbidität und die Mortalität. Diese äußern sich in Form von Infektionen des oberen und unteren Respirationstrakts, Gastroenteritiden, Hepatitiden, Myokarditis und Zystitiden (Hale et al. 1999, Lion et al. 2003)

### **2.3.1.1 BK-Virus-Infektion**

Im Jahr 1970 wurde das BKV erstmals im Urin eines Patienten nach Nierentransplantation nachgewiesen und nach dessen Initialen benannt. Das Virus verweilt nach der Primärinfektion im frühen Kindesalter latent im Urogenitaltrakt. Das BKV reaktiviert typischerweise bei Abnahme der zellulären Immunität. Aus diesem Grund ist es nach hämatopoetischer HSZT von Bedeutung (Hirsch 2005a). Das BKV zählt zur Gruppe der Polyomaviren. Es ist ein non-enveloped DNA-Virus mit zirkulärer Doppelstrang-DNA. 70 - 90% der erwachsenen Bevölkerung sind BKV seropositiv (Krumbholz et al. 2006, Wade 2006). BKV-Genome wurden im Kortex und der Medulla der Niere gefunden. Das Virus wurde ebenfalls im Urether, in der Blasenschleimhaut und in der Prostata nachgewiesen (Hirsch und Steiger 2003).

Das Genom des Virus besteht aus drei Regionen: der Noncoding-Control-Region (NCCR), der Early-Structure-Region (ESR) und der Late-Structure-Region (LSR). Die NCCR beinhaltet die Proteine der Replikation, den Promoter und die Enhancer-Region. Die NCCR kann variieren. Man unterscheidet einen Archetypus und eine rearrangierte Form. Der Archetypus ist charakterisiert durch eine lineare Form und weist weder Tandem noch Wiederholungen auf. Die so genannte rearrangierte Form zeigt Duplikationen und Deletionen. Die ESR kodiert große und kleine T-Antigene. Die LSR kodiert das Agnoprotein sowie das virale Kapselprotein (Leung et al. 2005b, Leung et al. 2001).

Nach Nierentransplantation steht das Virus mit der Entstehung der Polyomavirus-assoziierten Nephropathie (PVAN) in Verbindung (Funk et al. 2006). Bei immuninkompetenten Patienten wird das BKV mit der Entstehung eines Blasenkarzinoms in Zusammenhang gebracht (Provenzano et al. 2006). Bei Patienten nach HSZT ist das BKV mit der hämorrhagischen Zystitis assoziiert.

### **2.3.1.2 Methoden zum BK-Virus-Nachweis**

Eine diagnostische Möglichkeit zur Detektion von BKV ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR dient der Amplifikation eines kurzen Segmentes eines DNA-Strangs, wobei es sich um eine Genregion oder eine nicht-kodierende Einheit handeln kann. Während einer PCR kommt es durch die im Thermocycler produzierte Wärme zur Spaltung der Wasserstoffbrücken und somit zum Vorliegen der DNA als Einzelstränge (Denaturation). Dies ermöglicht den Primern, sich an die komplementären Basen an der DNA anzulagern. Diesen Vorgang bezeichnet man als Annealing. Die Polymerase baut in 5'3'-Richtung freie Desoxynukleosidtriphosphate an die DNA an. Durch die Wiederholung des Vorgangs wird der DNA-Abschnitt dupliziert. Die klinischen Anwendungen der PCR sind vielfältig. Die qualitative PCR wird unter anderem genutzt, um Vaterschaftstests durchzuführen und genetische Fingerabdrücke für rechtsmedizinische Zwecke zu erzeugen. Die qualitative PCR der Polyomaviren ist gut etabliert, effektiv und höchst sensitiv. Sie wird als Goldstandard bezeichnet (Merlino et al. 2003, Whiley et al. 2001). Eine weitere Methode zum Nachweis von BKV ist die quantitative real-time-PCR (Q-PCR). Sie ist schnell und spezifisch und ermöglicht neben dem qualitativen Nachweis, eine Quantifizierung der BK-Viruslast in Urin und Blut (McNees et al. 2005). Eine dieser Techniken ist die des Light Cyclers®. Die Theramokammer des Light Cycler® Geräts ist zu enormen Temperaturanstiegen in kürzester Zeit in der Lage. Das Gerät sendet blaues Licht (470nm) aus. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green interkaliert, durch das blaue Licht angeregt, mit der DNA der Proben und emittiert Licht (Wellenlängen: 530nm, 640nm, 730nm). Dieses emittierte Licht wird vom Light Cycler® im F1 Kanal gemessen und ist proportional zur vorhandenen Menge der DNA. Mit der log-linear-Phase des Light Cyclers® wird die Konzentration der DNA bestimmt. Der Eintritt in diese Phase beschreibt den Zeitpunkt, in der die Produktkonzentration sich innerhalb eines Zyklus erstmalig verdoppelt. Je früher die log-linear-Phase erfolgt, desto höher ist die Konzentration an BKV/ml (Scheck 2006).

### **2.3.2 Hämorrhagische Zystitis**

Die HC ist eine bekannte Komplikation der HSZT (Hale et al. 2003, El-Zimaity et al. 2004, Wong et al. 2007b). Die HC steigert signifikant die Morbidität durch mögliche renale Komplikationen. Die Kosten der Behandlung steigen durch längere Krankenhausaufenthalte. Die HC kann zum Tode führen (Hale et al. 2003).

Die HC ist charakterisiert durch eine schmerzhafte Hämaturie und eine hämorrhagische Inflammation der Blasenmukosa. Die Manifestation der HC variiert von Mikrohämaturie (Stadium I) und Makrohämaturie (Stadium II) über Makrohämaturie mit Blutkoageln in der Blase (Stadium III) bis hin zur Hydronephrose und möglicher Niereninsuffizienz (Stadium IV) (Leung et al. 2005a, Erard et al. 2004). Die HC wird in 2 Formen unterteilt: Prätransplantationszystitis und Posttransplantationszystitis. Die Prätransplantationszystitis ist bedingt durch die Irritation der Blasenschleimhaut mittels Chemotherapeutika. Zu diesen zählen Cyclophosphamid und Ifosphamid. Die Prätransplantationszystitis ist meist selbst limitierend und geht nicht über das Stadium II hinaus. Die Behandlung erfolgt konservativ mit forcierter Diurese. Die Ursache der Posttransplantationszystitis hingegen gestaltet sich multifaktoriell. Man nimmt einen Zusammenhang von viralen Infektionen durch BKV oder Adenoviren, Chemotherapeutika, Radiatio und alloimmune Reaktionen von Lymphozyten des Fremdspenders mit den uroepithelialen Zellen des Empfängers an. Eine HC nach HSZT verläuft meist progredient und kann über das Stadium II hinausgehen. Oft muss zusätzlich zu einer konservativen Therapie eine weiterführende Therapie in Form von Zystoskopie und suprapubischen Kathetern veranlasst werden (Leung et al. 2005a, Vögeli et al. 1999). Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die zur Behandlung von HC Estrogen und sequentielle Vidrabine-Infusion erfolgreich einsetzten (Ordemann et al. 2000, Vianelli et al. 2000).

### 3 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der hämorrhagischen Zystitis und ihrer Risikofaktoren, im Speziellen die BK-Virus-Assoziation, nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

147 Patienten, die zwischen 1/2000 und 12/2006 in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena transplantiert wurden, konnten in die Untersuchung eingeschlossen werden. Die Daten wurden auf folgende Fragestellungen hin untersucht:

(1)

- Wie viele BKV-Nachweise traten im Urin und im Blut nach HSZT auf?
- In welchem Zeitraum nach der Transplantation wurde das BKV nachgewiesen?
- Welche Häufigkeitsverteilung der BKV-Infektion gab es bei allogener und autologer Transplantation, bzw. bei Verwendung von Knochenmark, PBSZ und Nabelschnurblut?
- Welche Häufigkeitsverteilung der BKV-Infektion gab es bei der Konditionierung mittels Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung, bzw. bei der Verwendung von Busulfan, Cyclophosphamid und ATG?

(2)

- Wie häufig war die HC, wann trat sie erstmalig auf und wie war der zeitliche Verlauf?
- Wie viele Patienten mit HC schieden BKV im Urin aus und bei wie vielen Patienten mit HC konnten BKV im Blut nachgewiesen werden?
- Gab es einen Zusammenhang zwischen Patientenalter, Patientengeschlecht, der Verwendung von bestimmten Konditionierungsregimen, Transplantationsart und Stammzellquelle mit einem vermehrten Auftreten von HC?
- Wirkte sich eine akute Graft-versus-Host-Krankheit auf die Entstehung einer HC aus?

(3)

- Gab es Unterschiede in der BK-Viruslast im Urin zwischen Patienten mit und ohne HC?
- Gab es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der BK-Viruslast und der Gradausprägung der HC?
- Gab es einen Zusammenhang mit dem Patientenalter, Patientengeschlecht, der Verwendung von bestimmten Konditionierungsregimen, Transplantationsart und Stammzellquelle mit der Höhe der BK-Viruslast?
- Wirkte sich eine akute Graft-versus-Host-Krankheit auf die Höhe der BK-Viruslast aus?
- Zeigte sich ein Viruslastgrenzwert für die Entwicklung einer HC?
- Welche klinisch-pathologischen Parameter waren signifikante Risikofaktoren zur Entwicklung einer HC?

## 4 Patienten, Methoden und Material

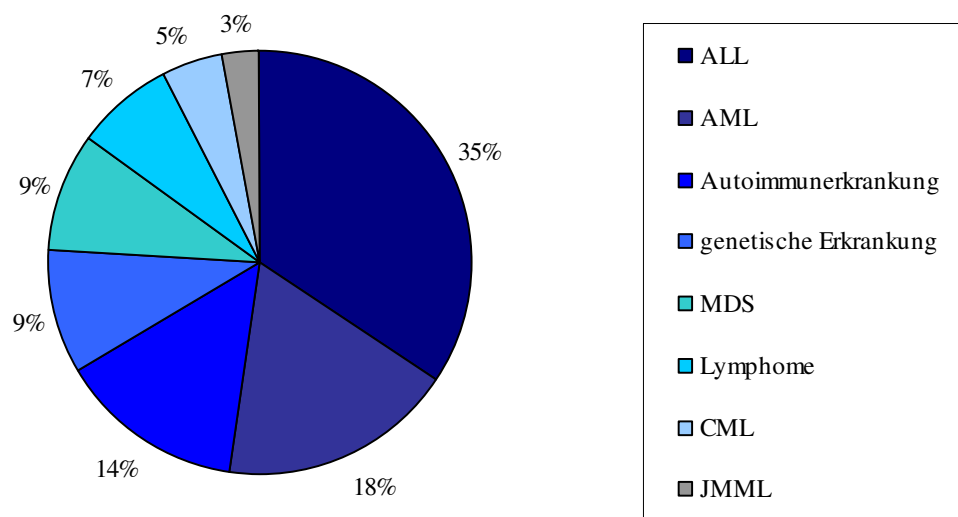
### 4.1 Patienten

#### 4.1.1 Patientencharakteristik

Von 01/2000 bis 12/2006 wurden in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Jena 147 Kinder mit hämatopoetischen Stammzellen transplantiert, davon 57 Mädchen (38,8%) und 90 Jungen (61,2%).

Die Patienten waren im Alter zwischen 1 Monat (*Min.*) und 25 Jahren und 4 Monaten (*Max.*). Das mediane Alter der Transplantierten war 12 Jahre und 1 Monat. Das mittlere Alter betrug 10 Jahre und 4 Monate.

Insgesamt wurden in der Kinderklinik der Universität Jena 165 Transplantationen an 147 Kindern durchgeführt. Folgende Erkrankungen lagen den Ersttransplantationen zu Grunde (vgl. Abb. 1).



**Abb. 1: Häufigkeiten der Erkrankungen bei Ersttransplantation**

Legende: ALL = akute lymphoblastische Leukämie; AML = akute myeloische Leukämie;  
 CML = chronische myeloische Leukämie; JMML= juvenile myelomonozytäre Leukämie;  
 MDS = Myelodysplastisches Syndrom



13 (8,8%) der insgesamt 147 transplantierten Patienten wurden mehr als einmal transplantiert. 12 dieser Patienten wurden wegen der gleichen Erkrankung mehrmals transplantiert, während bei einem Patienten zum Zeitpunkt der zweiten Transplantation eine neue Erkrankung vorlag.

Die Patienten mit genetischen Erkrankungen, Therapieversagen und Hochrisikogruppen wurden bereits in erster Remission transplantiert. Bei normgerechtem Verlauf der Vorbereitung auf die Transplantation wurden die Patienten in zweiter Remission transplantiert. Die Patienten, die nicht an einer genetischen Erkrankung oder einer schweren aplastischen Anämie litten, wurden in folgenden Stadien transplantiert (vgl. Tabelle 1):

**Tabelle 1: Remissionsstadien/Rezidivstadien**

<i><b>Stadium</b></i>	<i><b>Anzahl (n)</b></i>
erste Remission	31
zweite Remission	20
dritte Remission	6
vierte Remission	1
partielle Remission	16
Progression	3
keine Remission erreicht/Stadium der Primärerkrankung	31
erstes Rezidiv	10
Zweites Rezidiv	5
erste chronische Phase (CML)	4

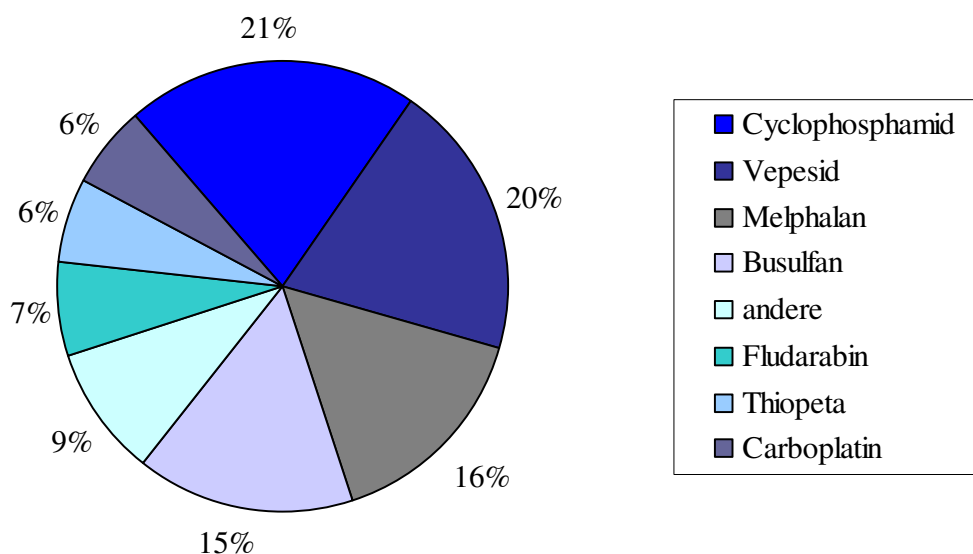
#### 4.1.2 Konditionierungscharakteristik

Die Konditionierung der Patienten vor der HSZT richtete sich nach der jeweiligen Grunderkrankung und deren Einordnung in Risikogruppen. Die Aufteilung der Transplantationen nach Chemotherapie und Radiochemotherapie dieser Promotion sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2: Anzahl der Chemo- und Radiochemotherapie bei 165 durchgeführten HSZT**

	<i>Autolog</i>	<i>Allogen</i>	<i>Gesamt</i>
Konditionierung			
- Chemotherapie	57	61	118
- Radiochemotherapie	2	45	47
<b>Gesamt</b>	<b>59</b>	<b>106</b>	<b>165</b>

Einige der Chemotherapeutika wurden häufig verwendet. Bei 165 wurde Transplantationen in 21% der HSZT Cyclophosphamid und in 20% Melphalan verwendet. In 16% der Fälle wurde Vepesid und in 15% Busulfan verabreicht. Zu 7% bzw. jeweils 6% kamen Fludarabin, Carboplatin und in 9% Thiothepa zum Einsatz. In 9% der Konditionierungstherapien verwendete man andere Chemotherapeutika. Zu diesen zählen unter anderem Methotrexat (MTX), Prednisolon, Cytosin- Arabinosid und Campath (vgl. Abb. 2)



**Abb. 2: Chemotherapeutikaverwendung bei allen 165 Transplantationen**

Mittels Antithymozytenglobulin (ATG) wurden 74 Patienten behandelt von denen 51 Patienten ATG Fresenius und 23 Patienten ATG Merieux erhielten.

#### 4.1.3 Transplantationscharakteristik

Um eine erfolgreiche Transplantation durchführen zu können, wurde ein Hickman-Katheter (zentralvenöser Verweilkatheter) vor Beginn der Konditionierungsphase durch die Klinik der Kinderchirurgie in Jena implantiert. Der Hickman- Katheter gewährleistete einen dauerhaften, zentralvenösen Zugang für Kontrollblutentnahmen, Konditionierungstherapie und weitere intravenöse Therapie. Im Umgang mit dem System wurde auf eine sterile Handhabung Wert gelegt. Bei Nichtverwendung wurde der Katheter mit Heparin geblockt.

Die Rasur des Kopfhaares diene der Dekontamination des Patienten. Am elften Tag vor Transplantation wurde mit der Darmdekontamination begonnen. Die hierzu verwendeten Medikamente und deren Dosen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Darmdekontamination**

<i>Medikamentöse Therapie</i>	<i>Dosis</i>
Trimethoprim (TMP) und Sulfamerazin	5 mg/kg/d TMP Anteil
Nystatin	100.000 IE/kg/d
Colisitin	150.000 IE/kg/d
Vancomycin	30-50 mg/kg/d

Zehn Tage vor der geplanten HSZT wurden die Patienten in eine sterile Laminar-Airflow-Einheit verlegt. Die Patienten erhielten sterile Nahrung und nach der Transplantation eine parenterale Ernährung.

59 autologe Transplantationen und 106 allogene Transplantationen wurden durchgeführt. Für die 106 allogenen Transplantierten wurden 38 Transplantate von Familienmitgliedern gespendet und 68 Transplantate von Fremdspendern. Eine ausführliche Charakteristik der Transplantationsart ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

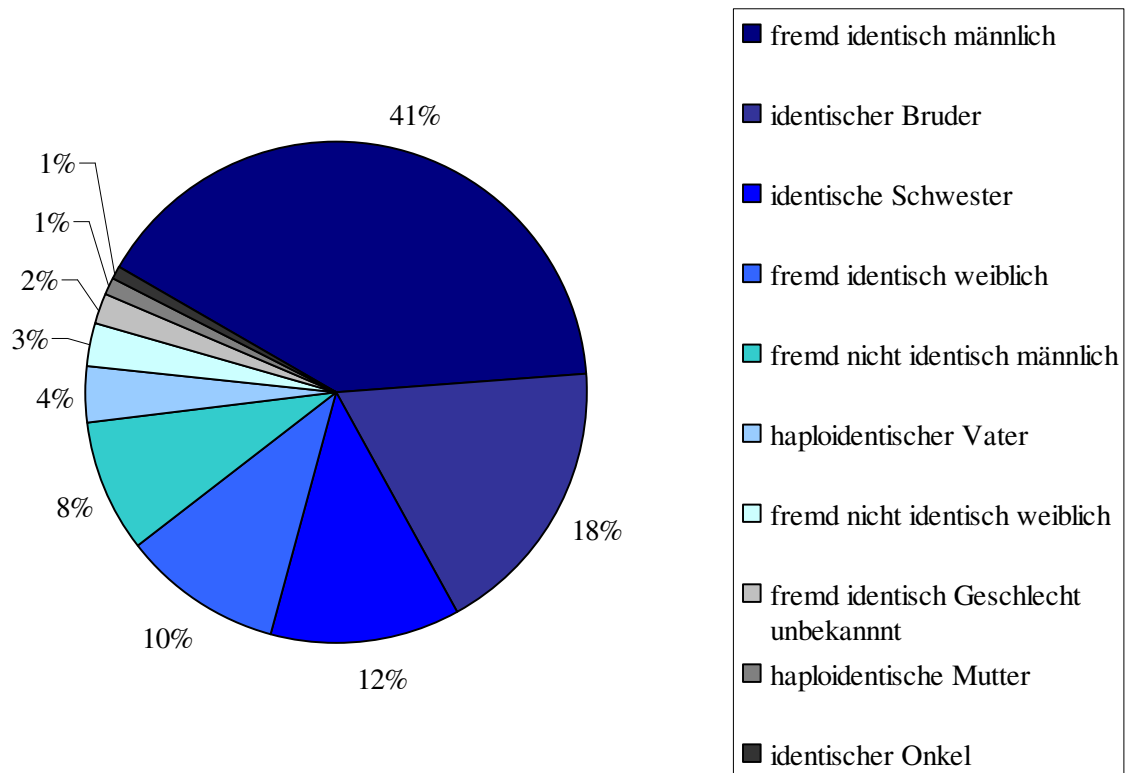
**Tabelle 4: Charakteristik der Transplantationsart**

	<i>Alle Transplantationen</i> <i>Anzahl (n)</i>	<i>Alle Patienten</i> <i>Anzahl (n)</i>
<b>Autolog</b>	<b>59</b>	<b>48</b>
<b>Allogen</b>	<b>106</b>	<b>99</b>
Familienspender	38	35
- identischer Familienspender	33	31
- haploidentisch	5	4
Fremdspender	68	64
- identisch	53	52
- nicht identisch	15	12
<b>Gesamt</b>	<b>165</b>	<b>147</b>

Als identisch wurde ein Spender anerkannt, wenn in folgenden Loci eine Übereinstimmung zu finden war:

- HLA A
- HLA B
- HLA C
- HLA DRB1
- HLA DQB1

In der folgenden Abbildung 3 sind die Geschlechter der Spender nach identischer und nicht identischer Stammzellquelle aufgeführt:



**Abb. 3: Geschlecht der Spender bei allen allogenen Transplantationen**

Um ein Anwachsen des Transplantates zu gewährleisten, muss eine genügend große Menge an Stammzellen transplantiert werden. Es wurden Knochenmark, PBSZ, CD34<sup>+</sup> selektionierte Stammzellen und Nabelschnurblut verwendet. Die Anzahl der jeweils verwendeten Stammzellquellen der Kinderklinik sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Verwendete Stammzellquelle**

<i><b>Stammzellquelle</b></i>	<i><b>Alle Transplantationen Anzahl (n)</b></i>	<i><b>Alle Patienten Anzahl (n)</b></i>
PBSZ	48	40
Knochenmark	61	57
CD34 <sup>+</sup> selektionierte PBSZ	48	44
Nabelschnurblut	1	1
Knochenmark/PBSZ	7	3
<b>Gesamt</b>	<b>165</b>	<b>147</b>

Legende: PBSZ = periphere Blutstammzellen

Für die Transplantation von Knochenmark benötigt man  $>3 \times 10^8$  kernhaltige Zellen/kg Körpergewicht (KG). Für PBSZ werden  $>5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> Zellen/kg KG benötigt. Für die Transplantation von Nabelschnurblut werden  $>2 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> Zellen/kg KG gebraucht, wobei der Empfänger ein Körpergewicht von 50 kg nicht überschreiten sollte. Auf diese Vorgaben wurde Rücksicht genommen.

Bei den 147 transplantierten Patienten traten Komplikationen im Verlauf der Transplantation auf. Einige Verlaufsscharakteristika sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengestellt:

**Tabelle 6: Verlaufsscharakteristika**

<i><b>Charakteristika</b></i>	<i><b>Anzahl (n)</b></i>
<b>verstorben</b>	<b>56</b>
- Multiorganversagen	17
- Leukämie/Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	11
- GVHD (akut und chronisch)	4
- Infektion/Sepsis	6
- Tumor	8
- Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura	2
- Lungenblutung	1
- Lungenversagen	2
- Myokarditis	1
- unbekannte Todesursache	4
<b>GVHD</b>	<b>68</b>
- akut	28
- akut und chronisch	18
- chronisch	4
<b>Rezidiv/Progression</b>	<b>47</b>

Legende: GVHD = Graft-versus-Host-Erkrankung

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Klinische Proben und Bestimmung des Grades der HC**

Von 01/2000 bis 12/2006 wurden 79 Patienten positiv auf BKV-DNA im Urin getestet. Bei Verdacht auf eine Infektion und positivem Urinstatus (Erythrozyturie) wurde der Urin auf BKV untersucht. Für die Patienten, bei denen sich der Verdacht einer BKV-Infektion erhärtete, wurde das Plasma auf BKV getestet.

19 Patienten erkrankten an einer HC. Die HC wurde in folgende Schweregrade unterteilt:

- Grad 1: Mikrohämaturie
- Grad 2: Makrohämaturie
- Grad 3: Makrohämaturie und Koagel in der Blase
- Grad 4: Makrohämaturie, Koagel in der Blase und renale Dysfunktion

(Leung et al. 2005a).

Grad 1 und Grad 2 wurden als moderate HC zusammengefasst. Grad 3 und Grad 4 gemeinsam ergaben das Bild einer schweren HC. Somit wurde eine genauere statistische Auswertung gewährleistet.

### **4.2.2 DNA-Extraktion aus Blut- und Urinproben**

Die Isolierung der DNA erfolgte mit kommerziellen Kitsystemen. EDTA-Blut und Vollblut wurde 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand, Plasma bzw. Serum, wurde mit dem QIAamp® Blood Mini Kit, entsprechend der Anleitung, behandelt. Anschließend wurde die Probe mittels 1 x 60 µl AE-Puffer eluiert.

Zur Aufbereitung von DNA aus Urinproben wurde das QIAamp® Viral RNA Mini Kit verwendet. Die Eluierung der DNA aus dem Urin erfolgte mit 2 x 60 µl AE-Puffer.

AE-Puffer:

- 10 mM Tris-Cl
- 0,5 mM EDTA; pH = 9,0

### 4.2.3 Qualitative PCR zum Nachweis von BKV

Die verwendeten Primer wurden am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena durch Dr. E. Birch-Hirschfeld nach der Beschreibung von Randhawa hergestellt. Die Primer amplifizieren ein 127 bp großes DNA-Fragment der VP-1-Region der BKV-DNA.

**Tabelle 7: Primersequenz der BKV-PCR**

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
DUN 1	5' gCA gCT CCC AAA AAg CCA AAg 3'
DUN 2	5` CTg ggT TTA ggA AgC ATT CTA 3'

Legende: A = Adenin; C = Cytosin; g = Guanin; T = Thymin  
(Randhawa et al. 2004).

Die von der Promega GmbH, Mannheim, Deutschland hergestellten Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) wurden am Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena weiterverarbeitet.

Das Reaktionsgemisch zur BKV-PCR setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 5,0 µl der Probe
- Master Mix
  - 18,25 µl DEPC-Wasser
  - 10,0 µl Q-Solution
  - 5,0 µl Taq-Puffer
  - 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>
  - 0,25 µl Hot Star Taq-Polymerase
  - 8,0 µl dNPT-Mix (1,25 mM)
  - 1,0 µl sense-Primer (DUN 1)
  - 1,0 µl antisense-Primer (DUN 2)



Die BKV-PCR wurde mit dem „Hot CMV 38“ Programm des T3-Thermozyklers durchgeführt. Erster Schritt des Programms ist das 15 minütige Erhitzen auf 95°C. Es folgen 38 Zyklen des zweiten Schrittes, wobei sich 1 Zyklus aus 50 Sekunden bei 94°C, 50 Sekunden bei 55°C und 1 Minute bei 72°C zusammensetzt. 5 Minuten bei 72°C als Elongationsschritt und anschließende Abkühlung auf 4°C sind die letzten Schritte des Programms.

Während einer PCR besteht immer die Gefahr der Kontamination. Durch die Verwendung von kleinen Ausgangsmengen kann eine Verunreinigung der Proben und Kontamination der verschiedenen Abläufe der PCR zu erheblichen Verfälschungen der Ergebnisse kommen. Um dies zu vermeiden wurden folgende Maßnahmen getroffen:

- Tragen von Einmalhandschuhen zum sterilen Arbeiten
- Sterile Arbeitsplätze und Geräte, gewährleistet durch die Bestrahlung mit UV-Licht vor und nach einem Versuch
- Vorbereitung und Nachbereitung in unterschiedlichen Räumen
- Kontrolle der Sterilität durch Negativkontrollen

#### **4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese der viralen DNA**

60 ml von 2%igem Agarose-Gel wurden mit 1,2 g Agarose und 60 ml TBE-Pufferlösung hergestellt.

TBE-Puffer:

für Gesamtmenge von 1 l

- 54 g 0,045 M Tris
- 27,5 g 0,045 M Borsäure
- 0,01 M EDTA

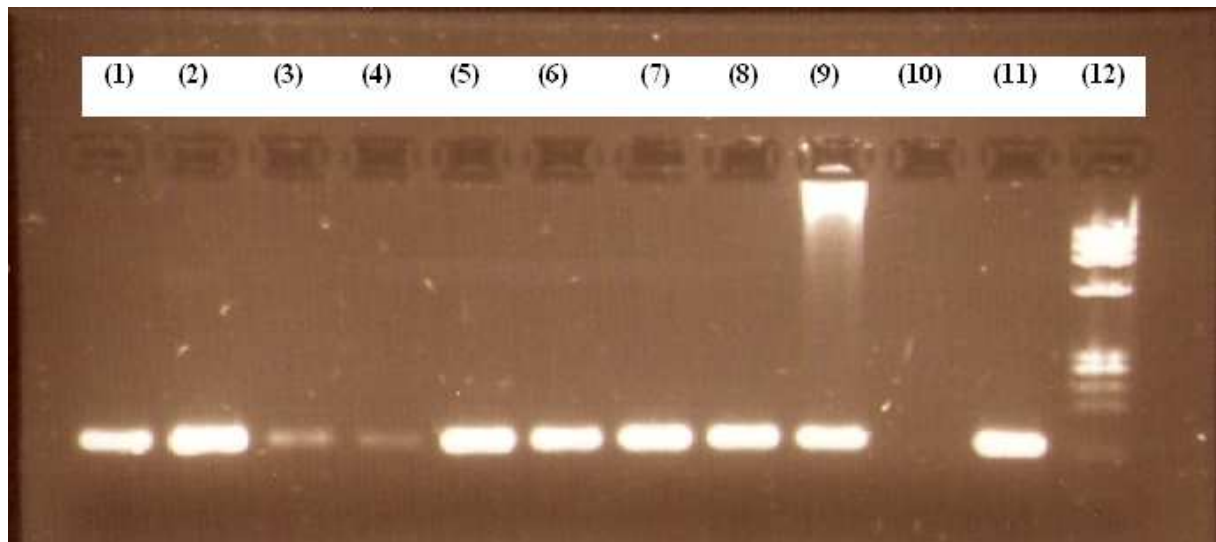
6 µl Ethidiumbromid wurden als interkalierende Substanz zugesetzt.

10 µl PCR-Amplifikate wurden mit 2 µl des Ladepuffers versetzt, welcher im Institut für Virologie des Universitätsklinikums selbst hergestellt wurde.

Ladepuffer:

- 50 mg Bromphenolblau
- 28 ml 10 mM EDTA-Lösung (pH 8,0)
- 13,67 ml 87%iges Glycerin

Die Stromversorgungsvorrichtung mit 90 mV wurde an das Elektrophoresegerät angelegt. Nach Beenden des Laufes wurde das Gel unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) mit einer Polaroid® Kamera dokumentiert (vgl. Abb. 4)



**Abb. 4: Agarose- Gelelektrophorese der spezifischen BKV- PCR:**

- Legende:
- (1) Urinprobe Patient 451
  - (2) Urinprobe Patient 451
  - (3) Blutprobe Patient 451
  - (4) Blutprobe Patient 451
  - (5) Urinprobe Patient 355
  - (6) Urinprobe Patient 355
  - (7) Urinprobe Patient 355
  - (8) Blutprobe Patient 355
  - (9) Blutprobe Patient 355
  - (10) Wasserkontrolle
  - (11) Postitivkontrolle
  - (12) Basenstandard

#### **4.2.5 Umgang mit den Proben**

Die Proben erhielten ihrem Eingangsdatum entsprechend eine Probennummer im Institut für Virologie und Antivirale Therapie Jena und wurden nach Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Zur Quantifizierung mit der Light Cycler® Technik wurden die Proben langsam aufgetaut und anschließend gevortext. Die Proben befanden sich zu keiner Zeit in den Räumen, in denen der Master Mix oder die Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Es wurden nur Proben quantifiziert, die mehr als zwei positive, qualitative PCR-Nachweise nach durchgeführter Stammzelltransplantation aufwiesen.

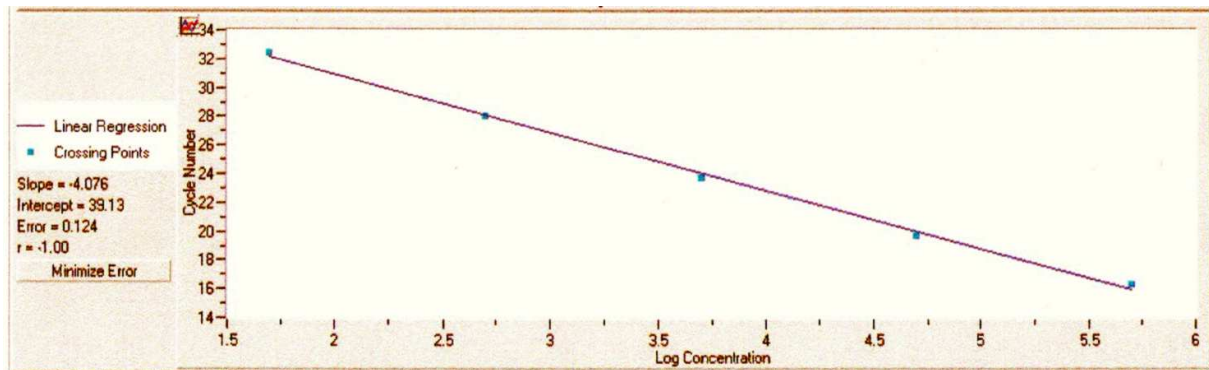
#### **4.2.6 Quantitativer BKV-Nachweis mittels Light Cycler®**

Mit der Plasmid-DNA wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentration der vorhandenen Plasmid-DNA war  $10^7$  Kopien/ml. 10 µl Plasmid wurden mit 90 µl TE- Puffer versetzt.

TE-Puffer:

- 10 mM Tris- HCl, pH 8,0

10 µl der entstandenen Plasmidverdünnung wurden wiederholend mit 90 µl TE-Puffer versetzt bis Plasmidverdünnungskonzentrationen von  $10^5$  Kopien/ml bis  $10^1$  Kopien/ml vorlagen. Anschließend wurden die Verdünnungsreihen gevortext. Es wurde darauf geachtet, dass die Plasmidverdünnungen während der Herstellung nicht in Berührung mit den zu untersuchenden Proben, oder mit dem vorbereiteten Master Mix kam. Im Laufe der Real-Time-PCR (Q-PCR) wurde der Crossing Point der Verdünnungsreihe bestimmt. Hierbei entstand eine Regressionsgerade, die zur Bestimmung der noch unbekannten Konzentration der BKV-DNA verwendet wurde (vgl. Abb. 5).



**Abb. 5: Linear Regression und Crossing Points am Beispiel des Versuches 13 vom 03.12.2007**

Ein Master Mix mit folgenden Komponenten pro Probe wurde angesetzt:

- 3 µl DEPC-Wasser (1 mg Diethylpyrocarbonat, 999 ml destilliertes Wasser)
- 10 µl 2x QuantiTect™ SYBR® Green Master Mix
- 1 µl Primer DUN1
- 1 µl Primer DUN2

Der Quanti-Tec™ SYBR® Green Master Mix enthielt bereits HotStarTaq-DNA-Polymerase, HotStarTaq-PCR-Puffer, dNTP Mix mit dUTP, SYBR® Green I und 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Zu diesem Master Mix wurde jeweils 5 µl Template DNA hinzugegeben. Unter einer Abzugshaube wurde das Reaktionsgemisch in 20 µl Glaskapillarröhrchen (Light Cycler® Kapillaren) gegeben. Die Glaskapillaren wurden anschließend anzentrifugiert und zusammen mit den Verdünnungsreihen vorsichtig in den Thermocycler transferiert.

Der Light Cycler® besteht aus einer Thermokammer, die in der Lage ist, schnelle Temperaturwechsel zu vollziehen. Der Light Cycler® erhitze die Kammer auf 95°C für 1200 sec, was dazu führte, dass die DNA sich in ihre Stränge spaltete (Denaturation). Anschließend folgten 40 Zyklen von je 20 Sekunden bei 94°C, 35 Sekunden bei 55°C und 35 Sekunden bei 72°C. Durch die Temperaturschwankungen waren die Primer in der Lage, sich an ihre komplementären Loci auf der DNA anzulagern. Mittels der Taq-Polymerase verdoppelten sich die Stränge (Amplifikation). Anschließend folgte ein Zyklus bei 50°C (Melting) und ein Zyklus zum Abkühlen des Reaktionsansatzes (Cooling).

#### 4.2.7 Berechnung der Viruslast

Die viralen Kopien-Äquivalente des Light Cycler® wurden auf die Volumina von Blut und Urin der Proben bezogen. Plasma wurde mit 60 multipliziert. Urin wurde mit 170 multipliziert. Die Multiplikationsfaktoren setzten sich aus den verschiedenen DNA-Aufreinigungsschritten der Proben zusammen. Die Quantifizierungsergebnisse wurden in Kopien pro Milliliter Blut oder Urin umgerechnet.

### 4.3 Materialien

#### 4.3.1 Reagenzien

**Tabelle 8: Reagenzien zur Eluatherstellung**

<i>Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>
Qiagen® Protease	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AE-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

**Tabelle 9: Reagenzien zur qualitativen PCR und Agarose-Gelelektrophorese**

<i>Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden Deutschland
Q-Solution	Qiagen GmbH, Hilden Deutschland
Taq-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden Deutschland
dNTP	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
DEPC	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Agarose-Gel	Serva Agarose for elektrophoresis, Serva Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Hidelberg, Deutschland

**Tabelle 10: Reagenzien zur Q-PCR**

<i><b>Reagenz</b></i>	<i><b>Hersteller</b></i>
RNAase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
2x Quanti Tec SYBR®Green RT-PCR Master Mix	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

#### 4.3.2 Geräte und Hilfsmittel

**Tabelle 11: Geräte und Hilfsmittel**

<i><b>Gerät</b></i>	<i><b>Hersteller</b></i>
Spin Collum / Filterröhrchen	Qiamap GmbH, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml	Eppendorf- Nethelder Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
T3- Thermocycler	Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresesystem Model 40- 0708	Regulab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Stromversorgungsgerät EC 250-90	Fa. Thermo Ec, Deutschland
Light Cycler® 2.0 System	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Deutschland
Light Cycler® Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Light Cycler® Kapillaren 20 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Pipetten 10 µl 100 µl 200 µl	Eppendorf-Nethelder-Hinz GmbH, Frickenhausen

#### 4.4 Statistische Methoden

Die der Dissertation zu Grunde liegende Statistik wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich Schiller Universität Jena erstellt. Alle verwendeten Daten der Patienten beruhen auf den Akten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena. Aus den Akten des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie Jena stammen die Daten und Proben der PCR.

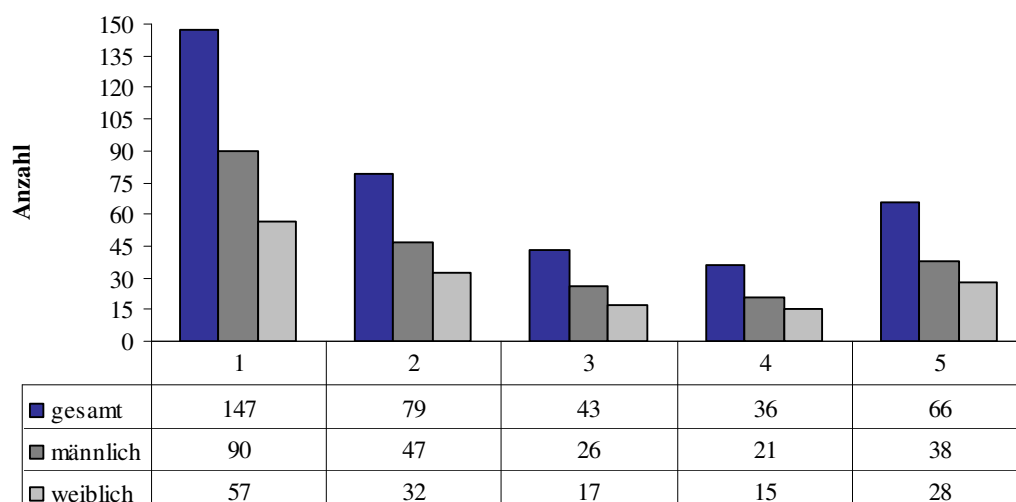
Zur statistischen Auswertung der Daten wurde der Chi-Quadrat-Test zur Prüfung der erwarteten Häufigkeiten für Patienten mit und ohne HC und deren signifikante Unterschiede verwendet. Falls eine erwartete absolute Häufigkeit unter 5 lag, wurde der Exakte Test nach Fischer verwendet. Die Altersverteilungen wurden mittels des t-Tests getestet. Patienten, die mehr als 2 BKV-Nachweise nach Transplantation im Urin und im Blut hatten, wurden quantifiziert. Bei den HC Patienten beschränkte man sich auf die Patienten, die zum Zeitpunkt der HC BKV im Urin ausschieden. Die medianen Viruslasten und die Viruslasthöchstwerte wurden innerhalb der zugeteilten Gruppen auf signifikante Unterschiede mittels des Mann-Whitney-Tests verglichen. In die univariate binär logistische Regressionanalyse zur Risikofaktorbestimmung wurden ausschließlich Faktoren eingeschlossen, die zeitlich eindeutig nur vor dem Beginn einer HC lagen. Zu diesen zählten: Alter des Patienten, Geschlecht des Patienten, Malignität der Diagnose, BK-Virurie vor Transplantation, Busulfan-Gabe, Cyclophosphamid, Kombination aus Busulfan und Cyclophosphamid, Bestrahlung und Stammzellquelle eines Fremdspenders. Faktoren, wie allogene Transplantation, welche einen bereits 100%igen Zusammenhang im Chi-Quadrat-Test aufwiesen, wurden nicht in die Risikofaktoranalyse eingeschlossen. So wurden Fehler in der Analyse der Odds Ratio (OR) der bereits eingeschlossen Faktoren vermieden. Die Berechnung der multivariaten binär logistischen Regressionsanalyse schloss nur die Faktoren ein, welche zuvor in der univariaten Analyse signifikant waren. Zur multivariaten Analyse wurde die „Rückwärts Ausschluss Option“ verwendet. Als statistisch signifikant wurden Ergebnis von  $p < 0,05$  anerkannt.

Sowohl die Durchführung der statistischen Tests, als auch die Erstellung der Boxplots erfolgte in SPSS® 15.0. Alle weiteren Diagramme wurden in Microsoft Office Excel® 2003 erstellt. Die Datensammlung erfolgte ebenfalls in diesem Programm. Die Erstellung des Texts erfolgte mit Microsoft Office Word® 2003. Das Literaturverzeichnis wurde mit Hilfe des studentisch zugänglichen [www.endnotweb.com](http://www.endnotweb.com) und dem Referenzprogramm EndNote® erstellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Qualitativer Nachweis des BKV bei allen transplantierten Kindern vor und nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Bei 79 von 147 Patienten (53,7%) konnte das BKV im Urin im Verlauf der Transplantation nachgewiesen werden. Bereits vor Transplantation fand man das BKV bei 43 Patienten (28,5%). Von diesen schieden 30 Patienten auch nach Transplantation weiter BKV aus. 36 Patienten (25,5%) schieden erst nach Transplantation nachweislich BKV durch den Urin aus. Insgesamt konnte bei 66 Patienten (45,6%) nach Stammzelltransplantation BKV im Urin nachgewiesen werden (vgl. Abb. 6).



**Abb. 6: Anzahl der BKV-Nachweise nach dem Geschlecht**

Legende:

- 1 = alle Transplantierten
- 2 = alle BKV-positive Patienten
- 3 = BKV bereits vor Transplantation ausgeschieden
- 4 = BKV erstmalig nach Transplantation nachgewiesen
- 5 = alle BKV-Nachweise nach Transplantation

47 von 90 Jungen (52%) und 32 von 57 Mädchen (57%) aller Transplantierten schieden BKV durch den Urin aus. Mittels des Chi-Quadrat-Tests wurde nachgewiesen, dass sich die Inzidenz des BKV-Nachweises bei Jungen und Mädchen nicht signifikant voneinander unterschied ( $p = 0,642$ ).



Das mittlere Alter der BKV-positiven Patienten betrug 11 Jahre und 9 Monate ( $Min = 0,1$ ;  $Max = 23,3$ ;  $SD = 6,9$ ). Die BKV-negativen Patienten waren im Mittel 8 Jahre und 7 Monate. Die BKV-positiven Patienten waren um 3 Jahre und 2 Monate signifikant älter ( $p = 0,003$ ) als die BKV-negativen Patienten.

Von den 66 Patienten, bei denen nach Transplantation BKV im Urin nachgewiesen wurde, wurden 48 Patienten (72,7%) allogene und 18 Patienten (27,3%) autolog transplantiert. Die Häufigkeitsverteilungen unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,159$ ).

43 von 66 BKV-Patienten (65,2%) wurden nur mittels Chemotherapie konditioniert, während 23 von 66 BKV-Patienten (34,8%) mittels Chemotherapie in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung konditioniert wurden. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant ( $p = 0,314$ ). Auch die Häufigkeitsverteilungen der Chemotherapie innerhalb der Gruppen, welche mit Busulfan und Cyclophosphamid in Kombination oder keine der beiden Medikamente erhielten, unterschieden sich nicht signifikant.

## 5.2 Diagnose der hämorrhagischen Zystitis und Schweregrade

Insgesamt erkrankten 19 (12,9%) der 147 transplantierten Patienten an einer HC. Bei einem der HC-Patienten (5,2%) konnte die Diagnose der HC bereits zwei Tage vor der geplanten Transplantation gestellt werden (Prätransplantationszystitis). 18 von 19 der HC-Patienten (94,8%) zeigten eine HC nach Transplantation (Posttransplantationszystitis). Bei 16 von 18 Posttransplantationszystitis-Patienten (88,8%) wurde die HC nach der ersten Transplantation diagnostiziert. Zwei der Posttransplantationszystitis-Patienten (11,2%) wurden mehrfach transplantiert. Bei diesen zwei Patienten wurde die HC erstmalig nach der zweiten Transplantation festgestellt.

Die 19 HC-Patienten zeigten unterschiedliche Schweregrade der HC:

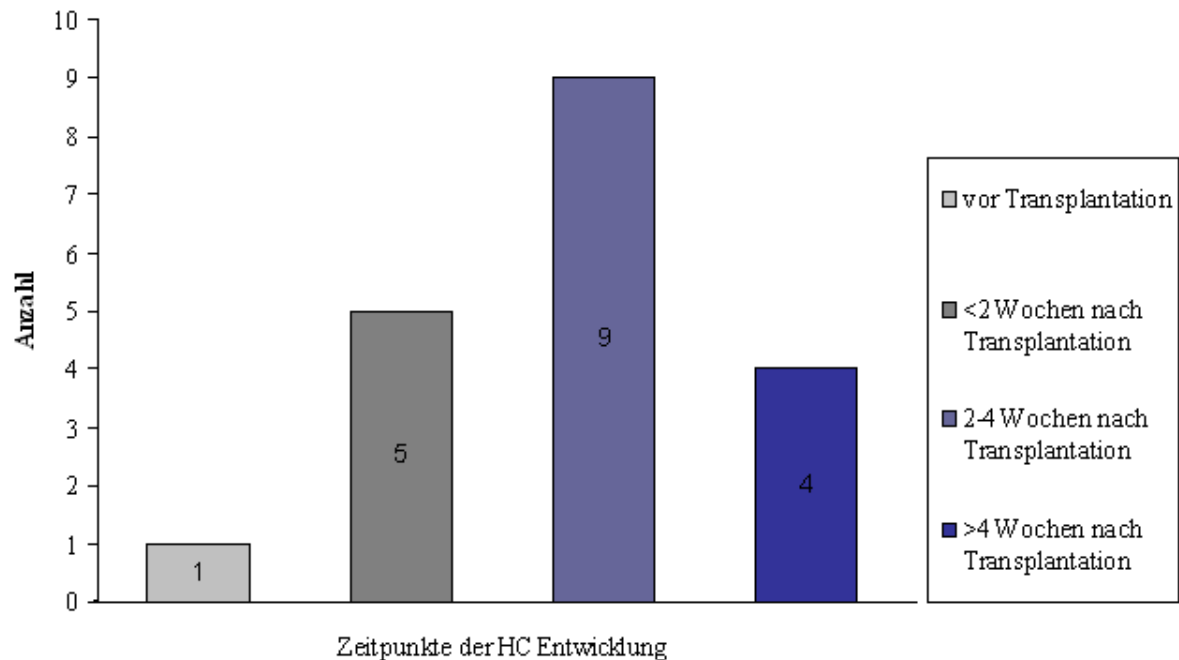
- Grad 1: Zwei Patienten (10,5%)
- Grad 2: Vier Patienten (21,1%)
- Grad 3: Sechs Patienten (31,5%)
- Grad 4: Sechs Patienten (31,5%)
- Bei einem Patienten konnte der Schweregrad durch die Verlegung des Patienten in ein ausländisches Krankenhaus nicht eruiert werden (5,4%).

Die 19 Patienten mit HC waren im Mittel 13 Jahre und 6 Monate alt ( $Min = 2,5$ ;  $Max = 23,3$ ;  $SD = 5,8$ ). Die HC-Patienten waren um 3 Jahre und 6 Monate im Mittelwert signifikant älter ( $p = 0,023$ ) als die transplantierten Patienten ohne HC. 4 von 19 HC-Patienten waren jünger als 12 Jahre. 15 von 19 Patienten waren älter als 12 Jahre ( $p = 0,025$ ).

Die Inzidenz der HC unter allen transplantierten Mädchen wurde mit 10,5% (6 von 57) ermittelt. 6 von 32 der BKV-positiven Mädchen (18%) entwickelten eine HC. Die Inzidenz der HC bei den männlichen Transplantierten lag bei 14,4% (13 von 90). 13 von 47 BKV-positiven Jungen entwickelten eine HC. Sowohl die Inzidenzen der HC unter allen Transplantieren Patienten, als auch die Inzidenzen der HC bei BKV-positiven Patienten unterschieden sich für Jungen und Mädchen nicht signifikant ( $p = 0,490$ ;  $p = 0,429$ ).

### 5.2.1 Zeitlicher Verlauf der HC

In der folgenden Abbildung 7 sind die Zeitpunkte des Beginns der HC dargestellt.



**Abb. 7: Zeitpunkte und Anzahlen der Entwicklung der HC**

Der früheste Zeitpunkt der Diagnose war der Tag +1 nach Transplantation. Der späteste Zeitpunkt der Diagnose war der Tag +98 nach Transplantation. Als medianer Zeitpunkt der Erstdiagnose für Posttransplantationszystitis wurde Tag +33 ermittelt.

Die HC dauerte im Median 35 Tage. Das Minimum der Tagesanzahl lag bei 5 Tagen. Das Maximum der HC-Dauer waren 109 Tage. Bei einem Patienten konnte die Dauer der HC nicht eruiert werden, da dieser nach Diagnosestellung in ein ausländisches Krankenhaus verlegt wurde.

## 5.2.2 Konditionierung, Transplantation und klinischer Verlauf der HC

Die Grunderkrankung für die Transplantation war in 121 Fällen maligner Genese. 17 Patienten (14%) mit maligner Grunderkrankung entwickelten eine HC. 2 von 24 Patienten (7,7%) mit genetischer Grunderkrankung erkrankten an einer HC. Mittels des Chi-Quadrat-Tests stellte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der HC heraus ( $p = 0,382$ ).

Die Patienten wurden mit Chemotherapie und Radiochemotherapie auf die Transplantation vorbereitet. Die Inzidenz der HC unter den Patienten, die nur Chemotherapie erhielten, war 11,8% (12 von 102). Die Inzidenz der HC bei Patienten mit Chemotherapie und Radiotherapie war 15,6% (7 von 45). Mittels Chi-Quadrat konnte kein signifikanter Unterschied im Prinzip der Konditionierung festgestellt werden ( $p = 0,528$ ).

Die Inzidenz der HC Patienten unter den Konditionierten mit BU lag bei 25,5% (12 von 47), während die Inzidenz der HC-Patienten ohne BU-Gabe nur 7,0% (7 von 100) betrug. Mittels des Chi-Quadrat-Test konnte ein signifikanter Anstieg der HC-Häufigkeit bei Patienten mit Busulfan-Konditionierung ermittelt werden ( $p = 0,009$ ).

Mit CY wurden 12 HC-Patienten konditioniert, was einer Inzidenz von 17,6% (12 von 68) entsprach. Die Häufigkeit einer HC bei den Patienten ohne CY während der Konditionierung war 8,9% (7 von 79). Die Inzidenz der HC bei den Patienten mit CY war nicht signifikant höher als bei den Patienten ohne CY ( $p = 0,113$ ).

Die Inzidenz der HC Patienten BU/CY in Kombination betrug 26,7% (12 von 33), während die Inzidenz der HC-Patienten ohne BU/CY-Kombination bei 6,9% (7 von 102) lag. Es konnte ein signifikanter Anstieg der HC-Häufigkeit bei Patienten mit Busulfan und Cyclophosphamid in Kombination ermittelt werden ( $p = 0,001$ ).

Alle Patienten, die eine HC entwickelten und mit BU oder CY in der Konditionierung transplantiert worden, erhielten diese Medikamente in Kombination. 7 von 19 HC-Patienten erhielten weder BU noch CY noch in Kombination.

Mit einer Inzidenz von 16,4% (12 von 73) wiesen ATG konditionierte Patienten keine signifikante Häufigkeitssteigerung einer HC gegenüber den Patienten ohne ATG und mit HC auf. Ohne ATG wurden 7 von 74 Patienten mit HC (9,5%) konditioniert. ( $p = 0,207$ ).

Die Inzidenz, eine HC zu entwickeln, lag bei den allogenen transplantierten Patienten bei 17,9%. Für alle autolog transplantierten Patienten wurde keine Neuerkrankung mit HC festgestellt. Die Inzidenzen der HC unter den autolog und allogenen transplantierten unterschieden sich signifikant voneinander ( $p = 0,005$ ) (vgl. Tab. 12).

**Tabelle 12: Transplantationsart bei Prä- und Posttransplantationszystitis**

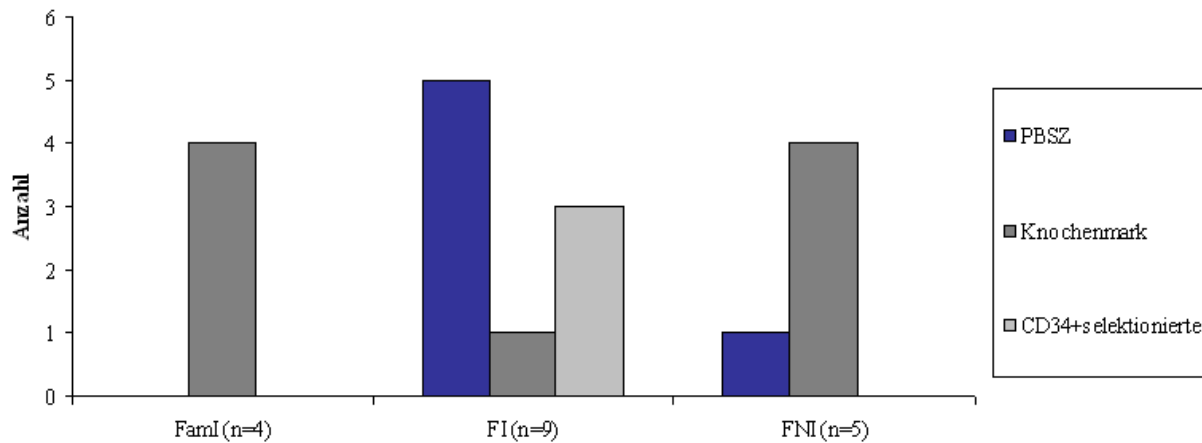
	<i>Autolog (59)</i> <i>Anzahl (n)</i>	<i>Allogen(106)</i> <i>Anzahl (n)</i>
Prätransplantationszystitis	0	1
Posttransplantationszystitis		
= erste HSZT	0	16
= Mehrfach-HSZT	0	2
<b>Gesamt</b>	<b>0</b>	<b>19</b>

Der Patient 369 mit Prätransplantationszystitis wurde 2 Tage nach erstmaligen klinischen Symptomen der HC mittels Knochenmark von einem identischen Familienspender allogenen transplantiert.

Der Patient 430/433 mit Posttransplantationszystitis nach Mehrfach-HSZT wurde direkt vor Ausbruch der HC mittels Stammzellen eines nichtidentischen Fremdspenders transplantiert.

Eine allogene Transplantation mittels peripherer Blutstammzellen eines identischen Fremdspenders wurde bei dem Patient 435 als zweite HSZT vor Manifestation der Post-THC durchgeführt.

Die 18 Patienten, die nach der Transplantation eine HC entwickelten sind nach der Art der Transplantation und deren verwendeten Materialien in der Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8: Anzahl der verwendeten Stammzellquellen nach der Transplantationsart bei Posttransplantationszystitis**

Legende: PBSZ = periphere Blutstammzellen  
 FamI = identischer Familienspender  
 FI = identischer Fremdspender  
 FNI = nicht identischer Fremdspender

Mittels des Exakten Tests nach Fischer wurden signifikante Unterschiede in den Spenderarten (fremd/nicht fremd) und deren Häufigkeit bei der HC ( $p = 0,028$ ) gefunden. Es wurden 15 von 83 Patienten (18,1%) mit Stammzellen eines Fremdspenders transplantiert, während nur 4 von 64 (6,3%) mit dem Stammzellen eines Nicht-Fremdspenders transplantiert worden waren.

Für die verwendete Stammzellquelle bei der Transplantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Ausprägung der HC ( $p = 0,068$ ).

46 von 147 Patienten entwickelten eine aGVHD. 6 von 46 entwickelten nach Diagnose der aGVHD eine HC. Weitere 6 Patienten entwickelten erst eine HC und dann eine aGVHD. 7 der HC-Patienten erkrankten nicht an einer aGVHD. Die Frequenz der aGVHD entsprach einer Inzidenz von 26% unter den Patienten mit HC. 7 von 101 Patienten (6,9%) ohne aGVHD entwickelten eine HC. Die Häufigkeit einer HC war signifikant höher, wenn die Patienten eine aGVHD im Verlauf der Transplantation entwickelten ( $p = 0,001$ ).

### 5.3 BKV und hämorrhagische Zystitis

Alle 19 Patienten (100%) mit HC schieden im Verlauf ihrer Grunderkrankung BKV im Urin aus. Bei 14 von 19 Patienten (73,7%) konnte das BKV im Urin zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der HC nachgewiesen werden. 5 von 19 HC-Patienten (26,3%) schieden zwar BKV durch den Urin aus, allerdings nicht zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und auch nicht im klinischen Verlauf der HC. Die BKV ließen sich in diesen Fällen im Urin vor und nach der HC, ohne dass ein zeitlicher Zusammenhang erkennbar war, nachweisen.

11 von 19 HC-Patienten (57,8%) wurden positiv auf BKV im Blut getestet, während die BKV im Blut bei Patienten ohne HC nur zu 8% (11 von 128) nachgewiesen werden konnten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung ( $p < 0,0001$ ). Außerdem fanden wir bei den Patienten ohne HC den BKV-Nachweis im Blut nur vereinzelt. Die HC-Patienten hingegen zeigten im Median 5 positive BKV-Produkte im Blut. Die Patienten mit schwerer HC zeigten vermehrt über 2 positive PCR-Nachweise (7 von 12; 58,8%). Bei den Patienten mit moderater HC waren es nur 2 Patienten, welche mehr als 2 positive PCR-Nachweise aufwiesen (2 von 6; 38,8%).

Bei 3 Patienten wurde die BK-Virämie erstmalig kurz vor Beginn der HC bzw. zum Diagnosestellungstag nachgewiesen. 8 der HC-Patienten mit BK-Virämie entwickelten diese erst kurz nach Ausbruch der HC-Erkrankung.

Bei den 5 HC-Patienten, die keine BKV im Urin zum Zeitpunkt der HC hatten, ließen sich keine weiteren zusammenhängenden Infektionen nachweisen. 2 von 5 Kindern hatten Adenoviren im Urin. Bei 4/5 Kindern ließen sich Bakterien im Urin nachweisen, die sich auf *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis* und *Staphylococcus epidermidis* beschränkten. Bei einem der Kinder konnte keine Infektion im Urin durch Bakterien, Viren oder Pilze nachgewiesen werden.

## 5.4 Quantitativer Nachweis des BKV

Insgesamt wurden von 51 Patienten, die BKV im Urin ausschieden die Viruslasten bestimmt. Dabei beschränkte man sich nur auf Patienten, die nach der Transplantation mindestens 2 positive Ergebnisse in der PCR des Urin aufwiesen. 14 der 51 quantifizierten Patienten wurden getestet, da nur diese Patienten zum Zeitpunkt der HC BK-Virurie aufwiesen. Berechnet wurden für die Patienten jeweils die median ausgeschiedenen Viruslasten und die Viruslasthöchstwerte, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

In die Quantifizierung der BKV-positiven Blutproben wurden ebenfalls nur die Patienten eingeschlossen, welche mehr als zwei positive PCR-Produkte aufwiesen. So wurden nur die BK-Viruslasten von 9 Patienten bestimmt, die alle an einer HC litten.

### 5.4.1 BK-Viruslast im Urin und Blut mit HC und deren Schweregrade

Die medianen Viruslastwerte im Urin für Patienten mit HC waren signifikant höher als für Patienten ohne HC ( $p = 0,001$ ) (vgl. Abb. 9). Die medianen Viruslasten der Patienten mit HC waren  $6 \times 10^8$  Kopien/ml Urin. Die Patienten ohne HC schieden median nur  $9 \times 10^5$  Kopien/ml Urin aus.

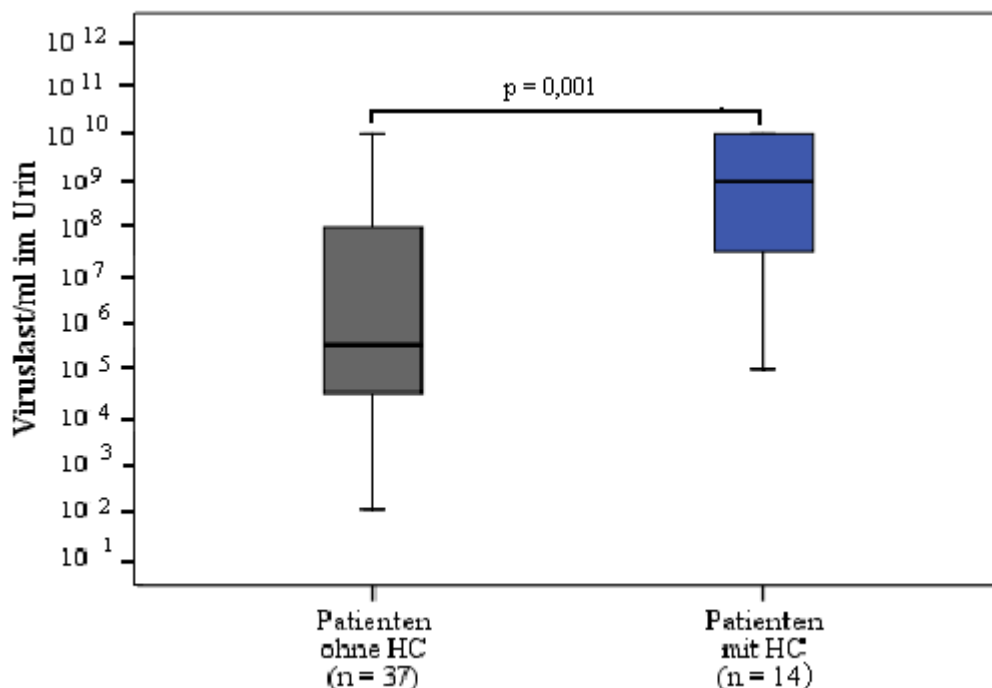


Abb. 9: Mediane Viruslastwerte im Urin für Patienten mit und ohne HC

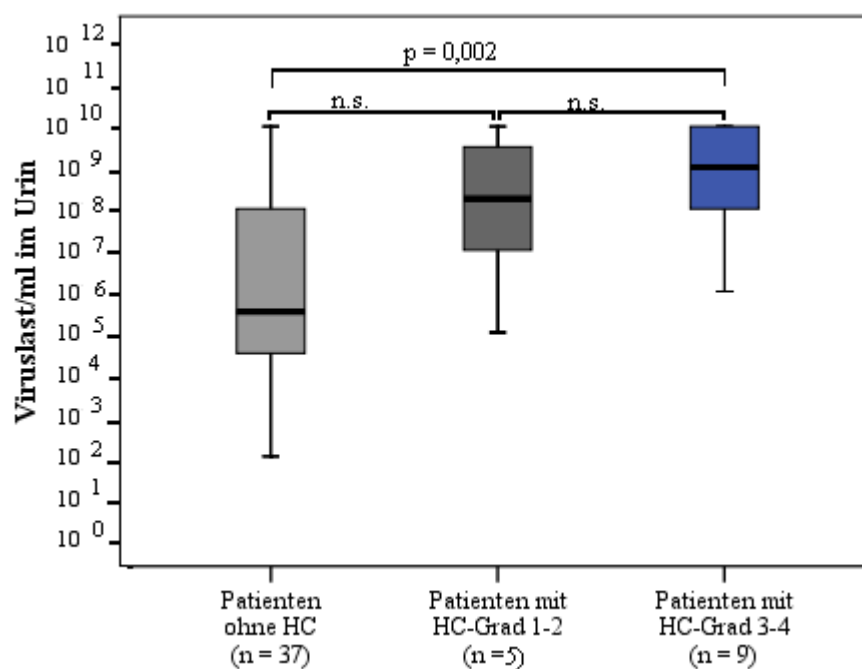
Legende: HC = hämorrhagische Zystitis



Die Viruslasthöchstwerte im Urin für die Patienten mit HC waren signifikant höher als die Viruslasthöchstwerte für Patienten ohne HC ( $p < 0,0001$ ).

Die Patienten mit HC zeigten unterschiedliche Schweregrade der Zystitis. Die Patienten mit Grad 1 - 2 unterschieden sich in Bezug auf die Viruslasthöchstwerte im Urin signifikant von den Patienten ohne HC ( $p = 0,019$ ). An Grad 3 - 4 erkrankte Patienten schieden signifikant höhere Viruslasthöchstwerte aus als die Patienten ohne HC ( $p = 0,002$ ).

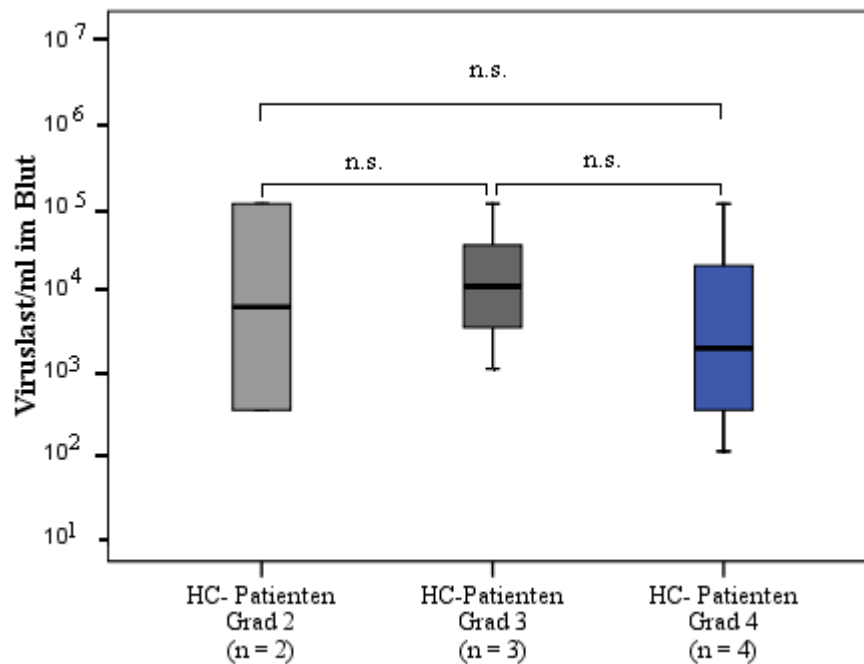
Obwohl die Patienten mit Grad 1-2 100fach so hohe mediane Viruslasten zeigten, unterschieden sie sich nicht signifikant von den Patienten ohne HC ( $p = 0,064$ ). An Grad 3 - 4 erkrankte Patienten unterschieden sich in Bezug auf die ausgeschiedenen medianen Viruslasten signifikant von den Patienten ohne HC ( $p = 0,002$ ) (vgl. Abb. 10).



**Abb. 10: Mediane Viruslasten im Urin für Patienten ohne HC und mit HC-Grad 1 - 2 und mit HC-Grad 3 - 4**

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

Bei 9 HC-Patienten ließen sich BKV im Blut nachweisen. Diese lagen zwischen  $10^2$  Kopien/ml Blut und  $10^6$  Kopien/ml Blut. In Bezug auf die Viruslasthöchstwerte im Blut unterschieden sich die Patienten mit dem HC-Grad 2 nicht signifikant von den Patienten mit HC-Grad 3 und auch nicht von HC-Grad 4 ( $p = 0,731$ ;  $p = 0,812$ ). Für die medianen Viruslasten im Blut im Vergleich der Gruppen ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (vgl. Abb. 11).



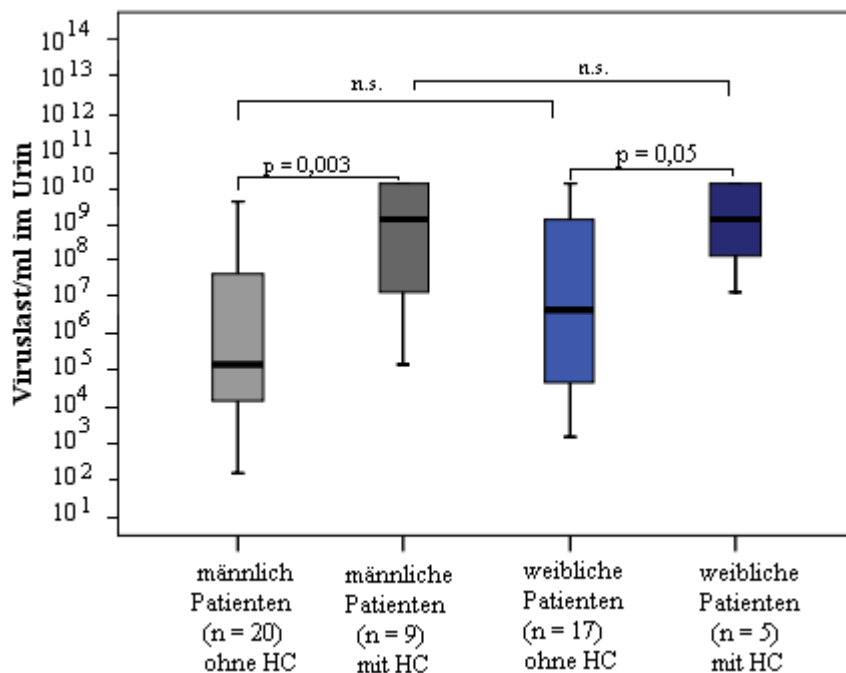
**Abb. 11: Mediane Viruslasten des Blut nach den HC-Schweregraden**

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

#### 5.4.1.1 Viruslast, HC, Geschlecht und Alter

Die Viruslasthöchstwerte der weiblichen HC-Patienten im Urin waren signifikant höher als die Viruslasthöchstwerte der weiblichen Patienten ohne HC ( $p = 0,04$ ). Die Viruslasthöchstwerte im Urin der männlichen Patienten mit HC unterschieden sich ebenfalls signifikant von den Höchstwerten im Urin der männlichen Patienten ohne HC ( $p = 0,002$ ). Die männlichen HC-Patienten waren nicht signifikant von den weiblichen HC-Patienten in Bezug auf die Virushöchstlast im Urin zu unterscheiden ( $p = 0,732$ ).

Die medianen Viruslasten der weiblichen HC-Patienten waren signifikant höher als die medianen Viruslasten der weiblichen Patienten ohne HC ( $p = 0,05$ ). Die medianen Viruslastwerte im Urin der männlichen Patienten mit HC unterschieden sich signifikant von den medianen Werten der männlichen Patienten ohne HC ( $p = 0,003$ ). Eine Darstellung der Ergebnisse folgt in der Abb. 12:

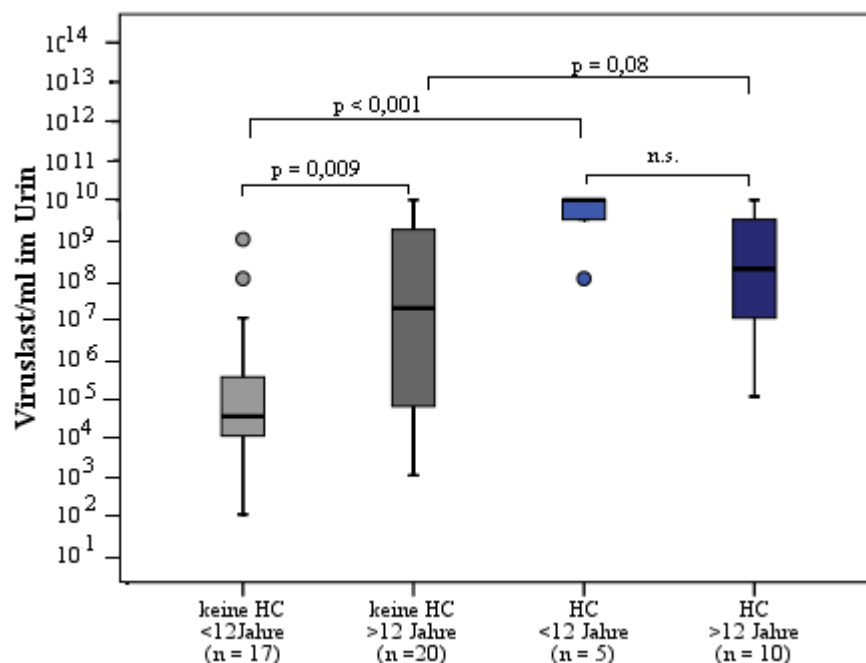


**Abb. 12: Mediane Viruslasten der Patienten mit und ohne HC nach dem Geschlecht**

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

In Bezug auf die Viruslasthöchstwerte im Urin schieden die Patienten ohne HC, sobald sie >12 Jahre waren, signifikant höhere Viruslasten aus. Bei den Patienten unter 12 Jahren ließen sich signifikant höhere Viruslasten im Urin verzeichnen, wenn die Patienten ein HC entwickelten.

Im Vergleich der median ausgeschiedenen Viruslasten in den Altersgruppen ergab sich, dass die Patienten ohne HC < 12 Jahre ( $9 \times 10^4$  Kopien/ml Urin) signifikant niedrigere Viruslasten ausschieden als die Patienten ohne HC >12 Jahre ( $1 \times 10^7$  Kopien/ml) ( $p = 0,009$ ). Bei allen Patienten unter 12 Jahren schieden die HC-Patienten deutlich höhere Viruslasten aus ( $p = 0,001$ ) (vgl. Abb. 13).



**Abb. 13: Mediane Viruslasten im Urin mit und ohne HC nach dem Alter**

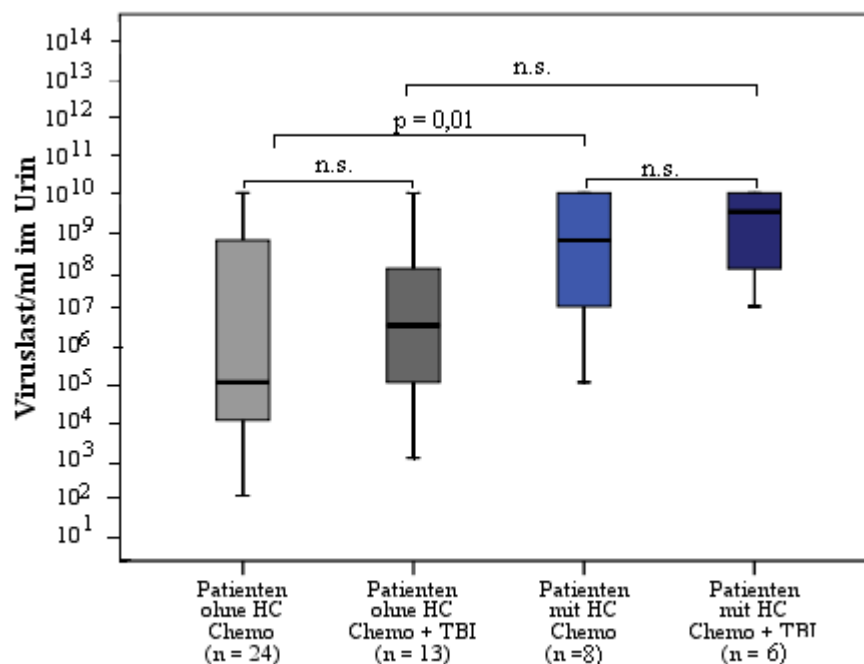
Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

### 5.4.1.2 Viruslast, HC und Konditionierungsregime

Um die Patienten hinsichtlich der Konditionierung mittels Chemotherapie oder Chemotherapie in Kombination mit Bestrahlung vergleichen zu können, wurden sie in folgende Gruppe unterteilt:

- Gruppe 1: Patienten ohne HC und Chemotherapie
- Gruppe 2: Patienten ohne HC und Chemotherapie + TBI
- Gruppe 3: Patienten mit HC und Chemotherapie
- Gruppe 4: Patienten mit HC und Chemotherapie + TBI

In Bezug auf die medianen Viruslasten unterschieden sich nur die Gruppen 1 und 3 signifikant voneinander ( $p = 0,01$ ). Obwohl die Gruppe 4 100fach so hohe mediane Viruslasten im Urin aufwies, unterschied sie sich nicht signifikant von der Gruppe 2 (vgl. Abb. 14).



**Abb. 14: Mediane Viruslasten im Urin der Patienten mit und ohne HC nach der Konditionierungsart**

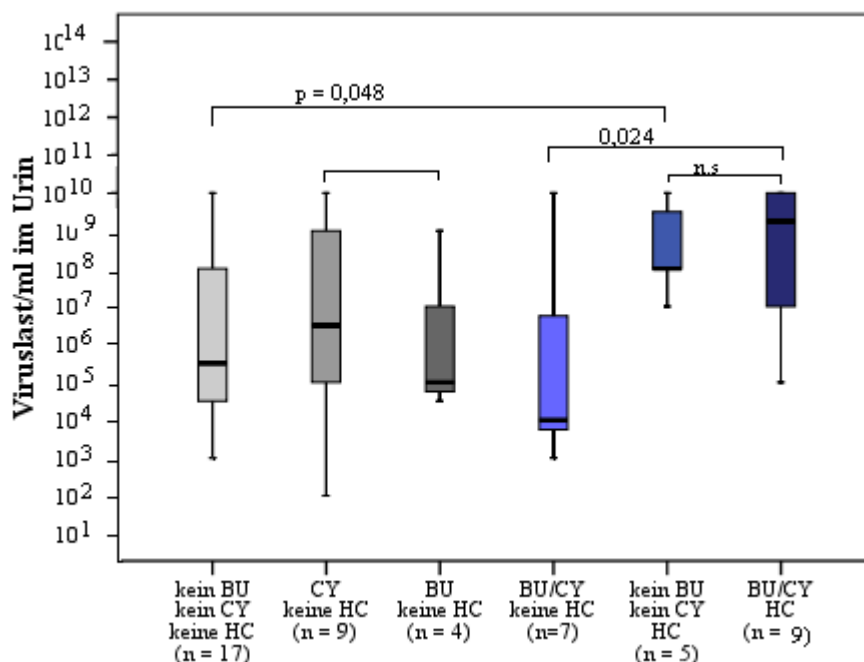
Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

TBI = Ganzkörperbestrahlung

Chemo = Chemotherapie

Die Viruslasthöchstwerte im Urin unterschieden sich in den Gruppen 1 und 3 und den Gruppen 2 und 4 ( $p = 0,021$ ;  $p = 0,017$ ). Die übrigen Unterschiede in den Ausscheidungen der Viruslasthöchstwerte im Urin der einzelnen Gruppen zeigten sich nicht signifikant.

Die zur Chemotherapie verwendeten Therapeutika wurden hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihrem Zusammenhang mit den Viruslasten untersucht. Die medianen Viruslasten der Patienten ohne BU/CY mit HC im Vergleich zu den Patienten ohne HC und ohne BU/CY waren signifikant höher ( $p = 0,048$ ). Auch die HC-Patienten die BU/CY in Kombination erhielten, besaßen signifikant höhere mediane Viruslastwerte als die Patienten ohne HC mit BU/CY ( $p = 0,024$ ) (vgl. Abb. 15).

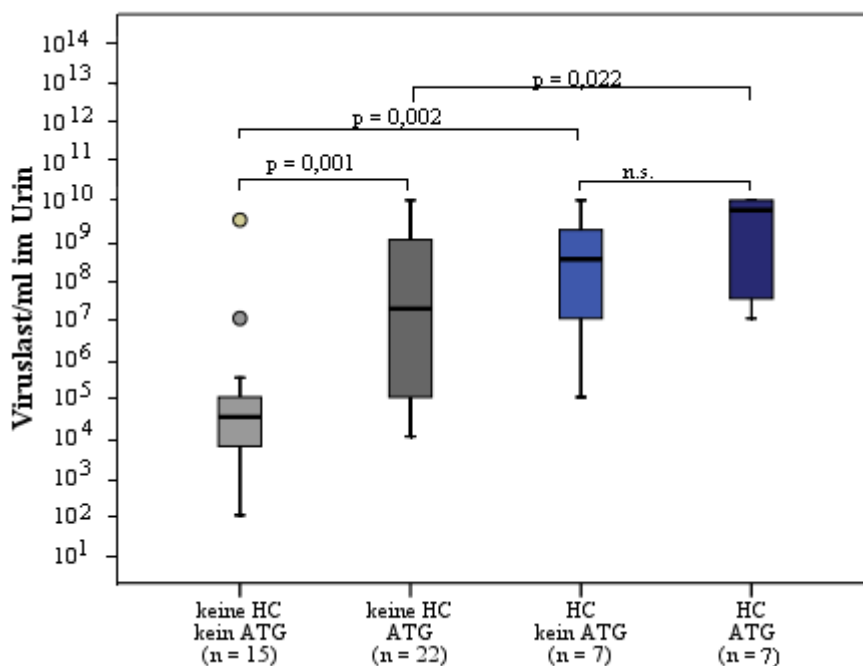


**Abb. 15: Mediane Viruslasten der Patienten mit und ohne HC nach dem Chemotherapeutikum**

Legende: BU = Busulfan  
CY = Cyclophosphamid  
HC = hämorrhagische Zystitis

Die Viruslasthöchstwerte der Patienten ohne BU/CY mit HC im Vergleich zu den Patienten ohne HC und ohne BU/CY waren signifikant höher ( $p = 0,013$ ). Die HC-Patienten, die BU/CY in Kombination erhielten besaßen im Trend höhere Viruslasthöchstwerte im Urin als die Patienten ohne BU/CY ( $p = 0,068$ ).

Für die medianen Viruslasten im Vergleich mit der Gabe von ATG und der Entwicklung einer HC ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Patienten, welche ATG bekamen und keine HC entwickelten, schieden mit  $2 \times 10^7$  Kopien/ml signifikant höhere Viruslasten im Urin aus, als die Patienten, welchen kein ATG gegeben wurde ( $6 \times 10^4$  Kopien/ml) ( $p = 0,001$ ). Die mediane Viruslast im Urin der Patienten mit und ohne HC und ATG-Gabe unterschieden sich signifikant ( $p = 0,037$ ). Die Patienten ohne ATG und HC wiesen signifikant höhere mediane Viruslasten im Urin auf als die Patienten ohne HC und ohne ATG ( $p = 0,002$ ) (vgl. Abb. 16).



**Abb. 16: Mediane Viruslasten im Urin der Patienten mit und ohne HC nach der ATG-Gabe**

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis  
ATG = Antithymozytenglobulin

Die Viruslasthöchstwerte im Urin der Patienten mit und ohne HC und ATG-Gabe unterschieden sich signifikant ( $p = 0,006$ ). Die Patienten ohne ATG und ohne HC wiesen signifikant höhere Viruslasthöchstwerte im Urin auf als die Patienten ohne HC und ohne ATG ( $p = 0,002$ ). Die Patienten, welche ATG bekamen und eine HC entwickelten, schieden signifikant höhere Viruslasten im Urin aus als die HC-Patienten, welchen kein ATG gegeben wurde ( $p = 0,003$ ).

### 5.4.1.3 Viruslast, HC, Stammzellquellen und Transplantationsart

Für die medianen Viruslasten im Urin konnten keine signifikanten Unterschiede in den HC-Patienten, welche mittels peripheren Blutstammzellen, Knochenmark oder CD34<sup>+</sup> selektionierte PBSZ transplantiert worden waren, gefunden werden. Auch in Bezug auf die Schweregrade im Zusammenhang mit der Stammzellquelle unterschieden sich die HC-Patienten nicht signifikant voneinander.

Die Viruslasthöchstwerte im Urin der HC-Patienten, welche mit PBSZ, Knochenmark oder CD34<sup>+</sup> selektionierten PBSZ transplantiert wurden, unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

In Bezug auf die medianen Viruslasten im Urin unterschieden sich einige der Gruppen der Transplantationsarten signifikant voneinander. Alle allogenen transplantierten Gruppen mit HC unterschieden sich signifikant von der Gruppe der autolog Transplantierten. Obwohl die allogenen Transplantierten ohne HC 100fach so hohe Viruslasten im Urin ausschieden als die autolog Transplantierten, unterschieden sie sich nicht signifikant ( $p = 0,077$ ) (vgl. Abb. 17).

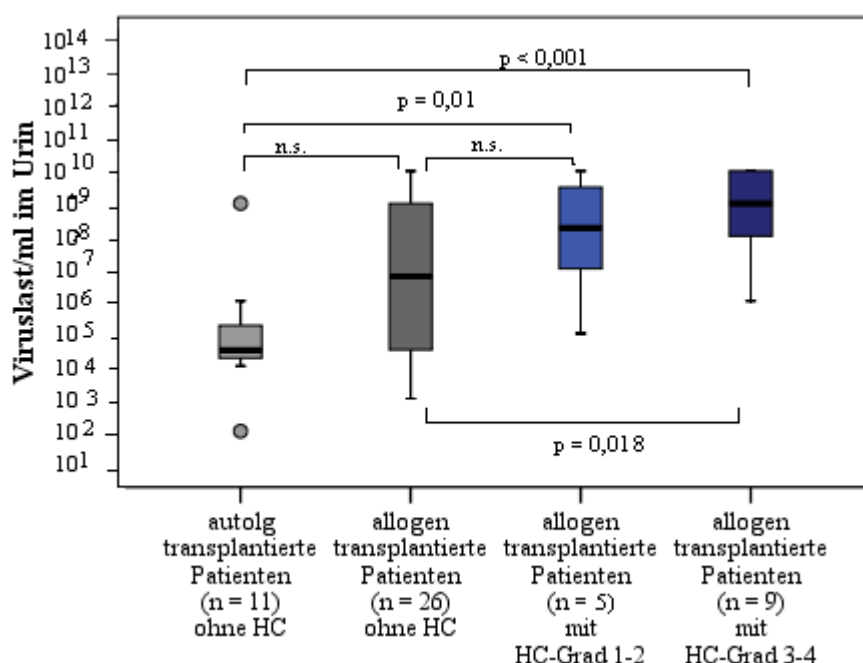


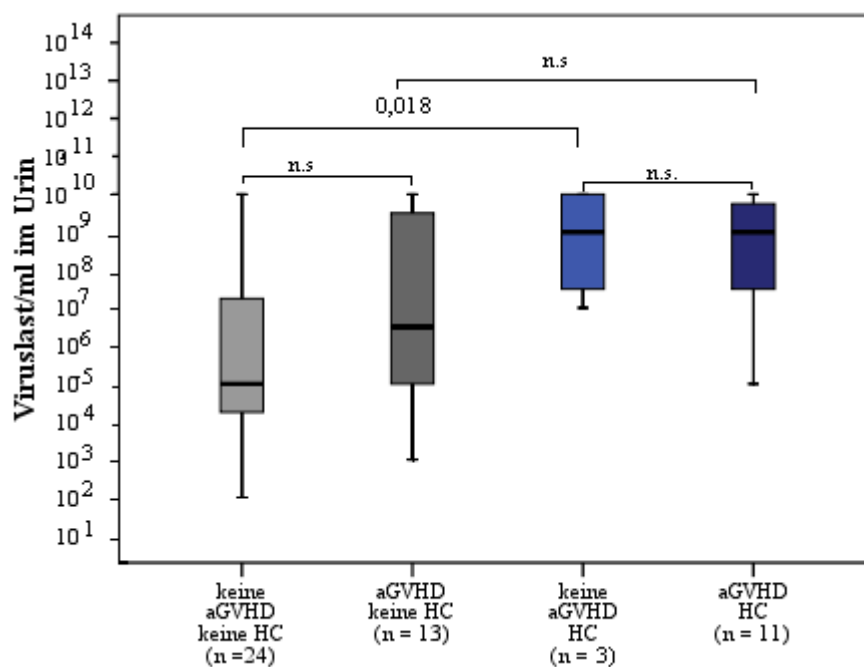
Abb. 17: Mediane Viruslasten im Urin nach Transplantationsart und Grad der HC

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis



#### 5.4.1.4 Viruslast, HC und klinischer Verlauf

In der folgenden Abb. 18 sind die Zusammenhänge der Viruslast mit der HC und der aGVHD dargestellt. Die Gruppen mit HC und aGVHD unterschieden sich nicht signifikant von der Gruppe mit aGVHD ohne HC, auch wenn die mediane Viruslastausscheidung um  $5 \times 10^2$  höher war ( $p = 0,188$ ). Die Gruppen mit HC unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander ( $p = 0,698$ ).



**Abb. 18 Mediane Viruslast im Urin in Bezug auf aGVHD- Patienten mit und ohne HC**

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

aGVHD = akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Viruslasthöchstwerte der aGVHD-positiven Patienten mit HC hingegen waren signifikant höher als die der Patienten mit aGVHD ohne HC. ( $p = 0,038$ ). Auch die Patienten ohne aGVHD schieden signifikant höhere Viruslasthöchstwerte aus, wenn eine HC vorlag.

### 5.4.2 Grenzwertanalyse

Quantifiziert wurden nur Patienten, die zwei oder mehr positive BKV-PCR-Produkte aufwiesen. Als Cut-Off-Wert wurde  $1 \times 10^7$  Kopien/ml Urin angenommen. Die Kreuztabelle ergab folgende Ergebnisse (vgl. Tabelle 13):

**Tabelle 13: Absolute Häufigkeiten der Patienten mit und ohne HC in Bezug auf den Grenzwert  $10^7$  Kopien/ml**

	<i>keine HC</i>	<i>HC</i>
$< 1 \times 10^7$	22	1
$\geq 1 \times 10^7$	15	13

Legende: HC = hämorrhagische Zystitis

Mittels des Exakten Testes nach Fischer zeigten sich signifikante Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen ( $p = 0,001$ ). 93,3% der HC-Patienten zeigten Viruslasten über  $10^7$  Kopien/ml im Urin. Die Sensitivität des Tests betrug 93%. Es ließen sich auch Viruslasten über  $10^7$  Kopien/ml im Urin bei Patienten ohne HC (15 von 37) nachweisen. Die Spezifität des Tests lag bei 59%. Eine durchgeführte ROC-Analyse zeigte keine Verbesserung der Spezifität des Tests bei Änderung des Grenzwertes, außer auf Kosten der Sensitivität.

## 5.5 Risikofaktorenanalyse

Mittels binärer logistischer univariater Regressionsanalyse wurden ein Alter >12 Jahren, Gabe von Busulfan, die Kombination aus Busulfan und Cyclophosphamid und die Stammzellquelle eines Fremdspenders als signifikante Risikofaktoren ermittelt (vgl. Tabelle 14).

**Tabelle 14.: Univariate Risikofaktorenanalyse**

<i>Risikofaktor</i>	<i>OR</i>	<i>95% Konfidenzintervalle für OR</i>	<i>p-Wert</i>
Grunderkrankung			
nicht maligne Erkrankung	1		
maligne Grunderkrankung	1,962	0,424 / 9,067	0,388
Geschlecht			
weiblich	1		
männlich	1,435	0,512 / 4,020	0,492
Alter			
< 12 Jahre	1		
> 12 Jahre	3,275	1,114 / 6,929	0,031*
CY			
kein Cyclophosphamid	1		
Cyclophosphamid	2,204	0,815 / 5,964	0,120
BU			
kein Busulfan	1		
Busulfan	3,514	1,307 / 9,446	0,013*
BU/CY			
kein BU/CY	1		
Kombination BU/CY	4,935	1,792 / 13,588	0,002*
Konditionierung			
Chemotherapie	1		
Chemotherapie + TBI	1,382	0,505 / 3,799	0,529
Antithymozytenglobulin			
kein ATG	1		
ATG	1,883	0,696 / 5,091	0,212

Spender			
kein Fremdspender	1		
Fremdspender	3,309	1,041 / 10,516	0,043*
BKV			
keine BK-Virurie vor Transplantation	1		
erstmalig BK-Virurie vor Transplantation	2,391	0,897 / 6,377	0,081

Legende :      \* = signifikanter Risikofaktor  
OR = Odds Ratio  
BU = Busulfan  
CY = Cylophosphamid  
BKV = BK-Virus  
ATG = Antithymozytenglobulin  
TBI = Ganzkörperbestrahlung

In die multivariate Analyse der binär logistischen Regression wurden die Risikofaktoren eingeschlossen, welche in der univariaten Analyse sich signifikant auf dem Niveau von  $p < 0,05$  zeigten (vgl. Tabelle 15)

**Tabelle 15: Multivariate Risikofaktoranalyse**

<i>Risikofaktor</i>	<i>OR</i>	<i>95% Konfidenzintervalle für OR</i>	<i>p-Wert</i>
> 12 Jahre	3,923	1,264 / 12,177	0,018*
BU	0,544	0,067 / 3,887	0,590
Kombination BU/CY	5,684	1,984 / 16,285	0,001*
Fremdspender	1,926	0,519 / 7,154	0,327

Legende:      \* = signifikanter unabhängiger Risikofaktor  
BU = Busulfan  
CY = Cyclophosphamid

Ein Alter > 12 Jahre zum Zeitpunkt der Transplantation und die Kombination aus BU/CY stellten sich als signifikante unabhängige Risikofaktoren eine HC zu entwickeln, dar.

## 5.6 Patientenverläufe

Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, werden im nachfolgenden Abschnitt Kasuistiken und Viruslastprofile von Patienten aus den Gruppen:

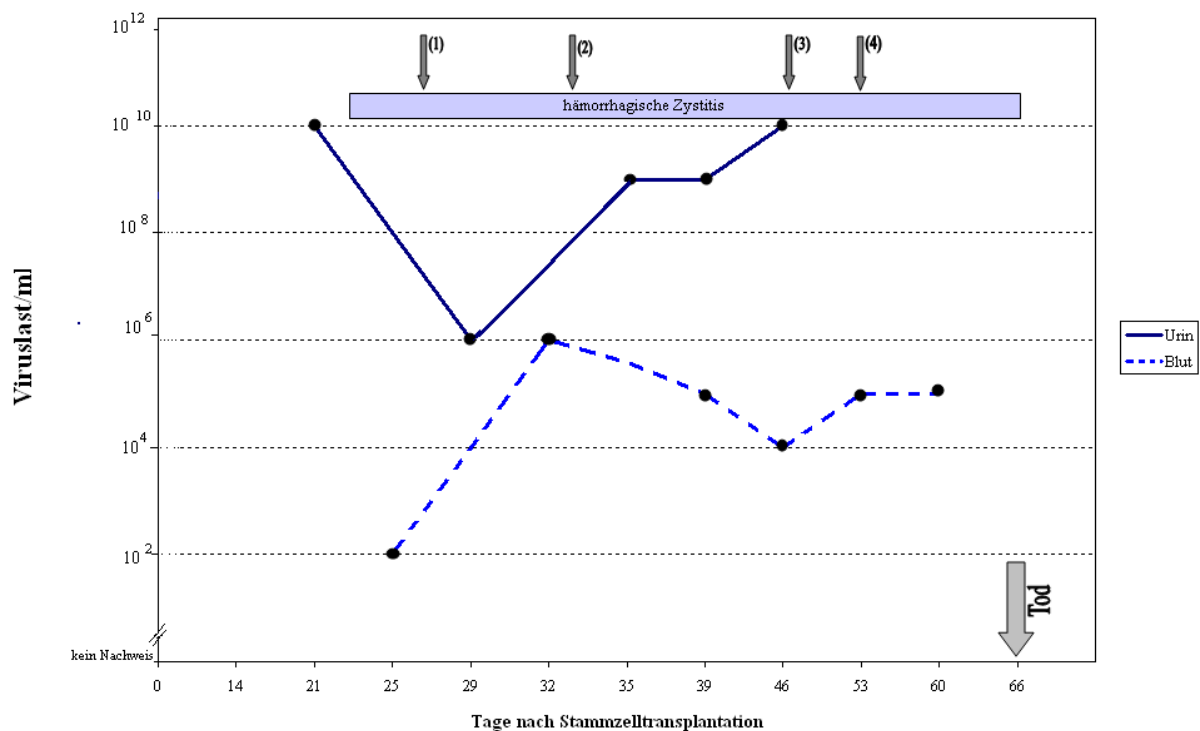
- keine HC, aber BK-Virurie
- HC Grad 1 – 2
- HC Grad 3 – 4

zusammengestellt.

### 5.6.1 Kasuistik Patient 355

Es handelte sich um eine 15 jährige Patientin, die wegen eines angeborenen Aase-Syndroms transplantiert worden war. Die Patientin wurde mit 4 x 4 mg/kg Busulfan, 3 x 2 mg/kg ATG Merieux, 4 x 50 mg/kg Cyclophosphamid und 3 x 2,5 Gy fraktionierter total nodaler Bestrahlung konditioniert. Die Patientin wurde mit CD34<sup>+</sup> selektionierten PBSZ eines allogenen Fremdspenders transplantiert. Der Fremdspender war 10/10 HLA- kompatibel, weiblich und CMV-negativ. Bis zum Zeitpunkt der Transplantatspende wurde die Spenderin nicht transfundiert und erlebte keine Schwangerschaft. Es wurden  $8,92 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> Zellen/kg KG und  $7,17 \times 10^4$  CD3<sup>+</sup> Zellen/kg in einem Volumen von 92 ml transfundiert. Am Tag 21 nach Transplantation klagte die Patientin erstmalig über Schmerzen beim Wasserlassen. Im Verlauf des Tages wurde eine Hämaturie festgestellt und in der sonografischen Kontrolle der Blase eine verdickte Blasenwand diagnostiziert. Am Folgetag zeigte die Patientin fortwährend eine Hämaturie. Sonographisch stellte sich eine 4,5 cm große Koagel in der Harnblase dar. Das Nierenbecken war auf 8 mm geweitet, die Nierenkelche waren nicht gestaut. Der Patientin wurde ein Blasenkatheter gelegt, die Infusionsmenge erhöht, Mictonorm und Pamba verabreicht. Da BKV im Urin und im Blut nachgewiesen werden konnten, begann man am Tag +27 mit der antiviralen Therapie. Im Verlauf der HC entwickelte die Patientin eine Harnstauung II° und eine Blasentamponade, welche operativ durch die Urologische Klinik der Universität Jena ausgeräumt wurde. Am Tag +33 sistierte die Urinproduktion und die Patientin wurde mittels Hämofiltration dialysiert. Der Allgemeinzustand der Patientin änderte sich im Verlauf drastisch, bis sie am Tag +66 nach HSZT verstarb. Die HC klang bis zum Todeszeitpunkt nicht ab.

Neben den BKV-Nachweisen im Urin und im Blut konnten bei der Patientin BKV auch im Sputum, im Trachealabstrich und in der bronchoalveolären Lavage (BAL) sowohl rechts als auch links nachgewiesen werden. Es kann von einer BKV-Sepsis ausgegangen werden. In der folgenden Abb. 19 sind die Verläufe der Viruslast von Urin und Blut der getesteten Proben im Verlauf dargestellt.



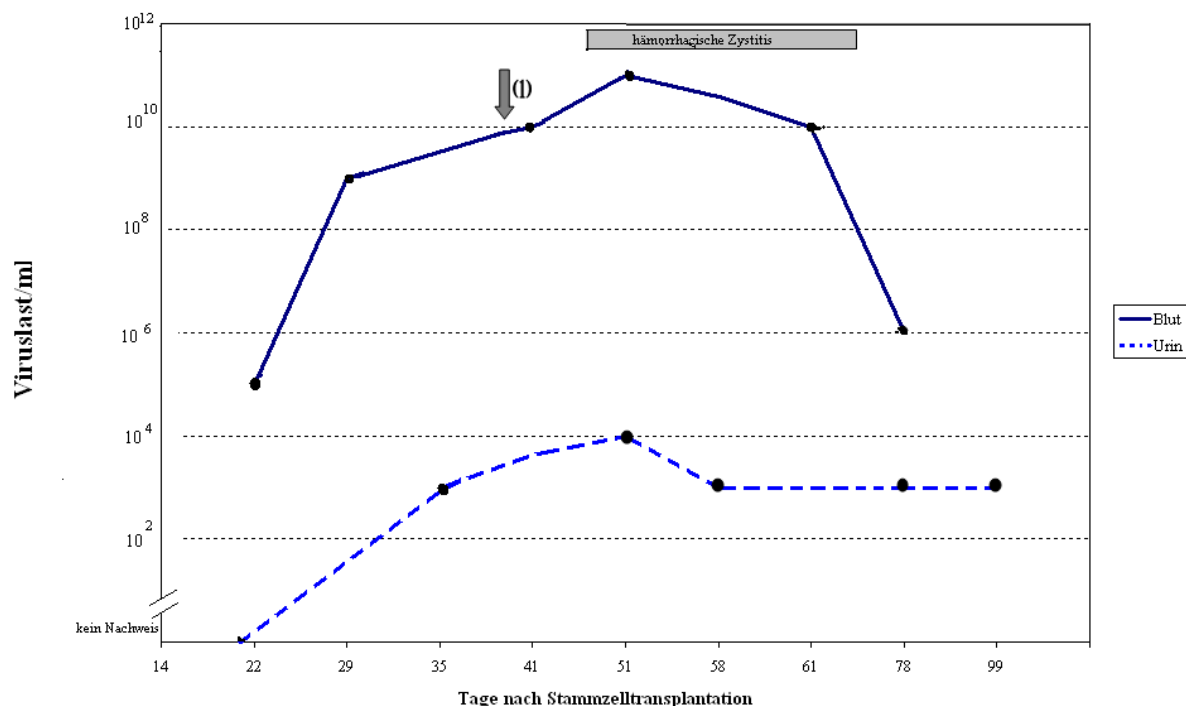
**Abb. 19: Verlauf der Viruslasten im Urin und Blut von Patient 355**

Legende:

- (1) Beginn der virusstatistischen Therapie
- (2) operative Ausräumung von Koageln
- (3) positiver BKV-Nachweis im Sputum durch qualitative PCR
- (4) positiver BKV-Nachweis im Trachealsekret, BAL rechts, BAL links durch qualitative PCR

### 5.6.2 Kasuistik Patient 451

Es handelt sich um eine 7 jährige Patientin, die auf Grund einer c-ALL transplantiert wurde. Sie wurde der Hochrisikogruppe zugeordnet und war für eine allogene Stammzelltransplantation qualifiziert. Sie wurde mit fraktionierter Gesamtkörperbestrahlung mit der Gesamtdosis 12 Gy bestrahlt. Des Weiteren erhielt die Patientin 1 x 60 mg/kg KG VP16 und 3 x 20 mg ATG „rabbit“ Fresenius. Die Patientin wurde mit 978 ml Stammzellen eines männlichen Fremdspenders transplantiert. Der Spender war serologisch CMV negativ und stimmte mit der Blutgruppe 0D mit der Empfängerin überein. Am Tag 48 nach Transplantation wurde bei der Patientin eine Mikroerythrozyturie nachgewiesen. Bereits am Folgetag entleerte sie Koagel aus der Blase und gab Urin nur in kleinen Portionen ab. Die Blasenschleimhaut war sonographisch unregelmäßig begrenzt und mit ca. 13 mm verdickt. Die Infusionsmenge wurde erhöht und Mictonorm verabreicht. Die Therapie mit Vistide wurde begonnen. Unter Therapie sistierten die Symptome.

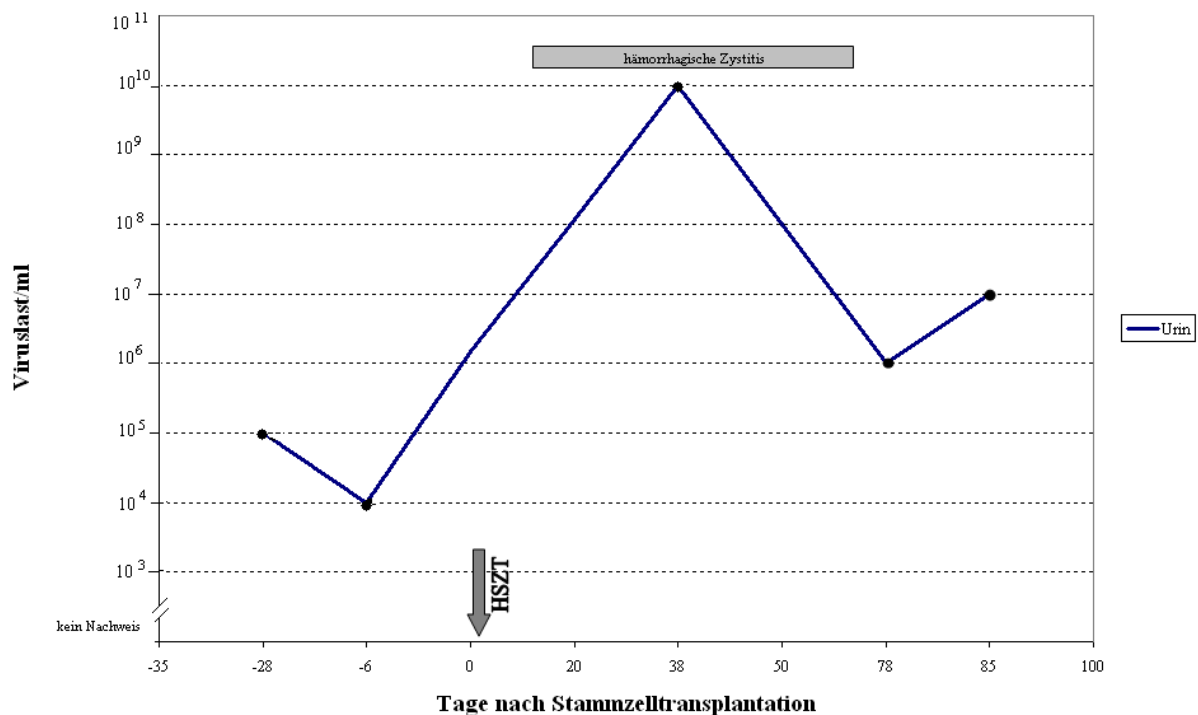


**Abb. 20: Verlauf der Viruslasten im Urin und im Blut von Patient 451**

Legende: (1) verdickte Harnblase und sonographischer Koagelnachweis

### 5.6.3 Kasuistik Patient 403

Der Patient 403 ist männlich und im Alter von 23 Jahren auf Grund einer akuten lymphoblastischen Leukämie transplantiert worden. Der Patient wurde mit Ganzkörperbestrahlung in Translationstechnik in 6 Fraktionen zu je 2 Gy, 16 mg VP16/kg KG, 3 x 20 mg/kg KG ATG rabbit Fresenius konditioniert. Außerdem erhielt der Patient eine GVHD-Prophylaxe mit CsA. Der Patient wurde mit PBSZ (V= 445 ml; CD34<sup>+</sup> Zellen = 8,23 x 10<sup>6</sup> kg/KG; CD3<sup>+</sup> Zellen 227,9 x 10<sup>6</sup> kg/KG) eines männlichen 10/10 HLA-kompatiblen Fremdspenders transplantiert. Der Spender war CMV-positiv. Am Tag 32 nach HSZT klagte der Patient erstmalig über Schmerzen beim Wasserlassen. Es zeigte sich eine Mikroerythrozyturie. Im Verlauf entwickelte sich eine Makrohämaturie. Die Infusionsmenge wurde erhöht und die Symptome ließen nach. Die HC zweiten Grades sistierte. Der Verlauf der Viruslast im Urin ist in der folgenden Abbildung dargestellt (vgl. Abb. 21):



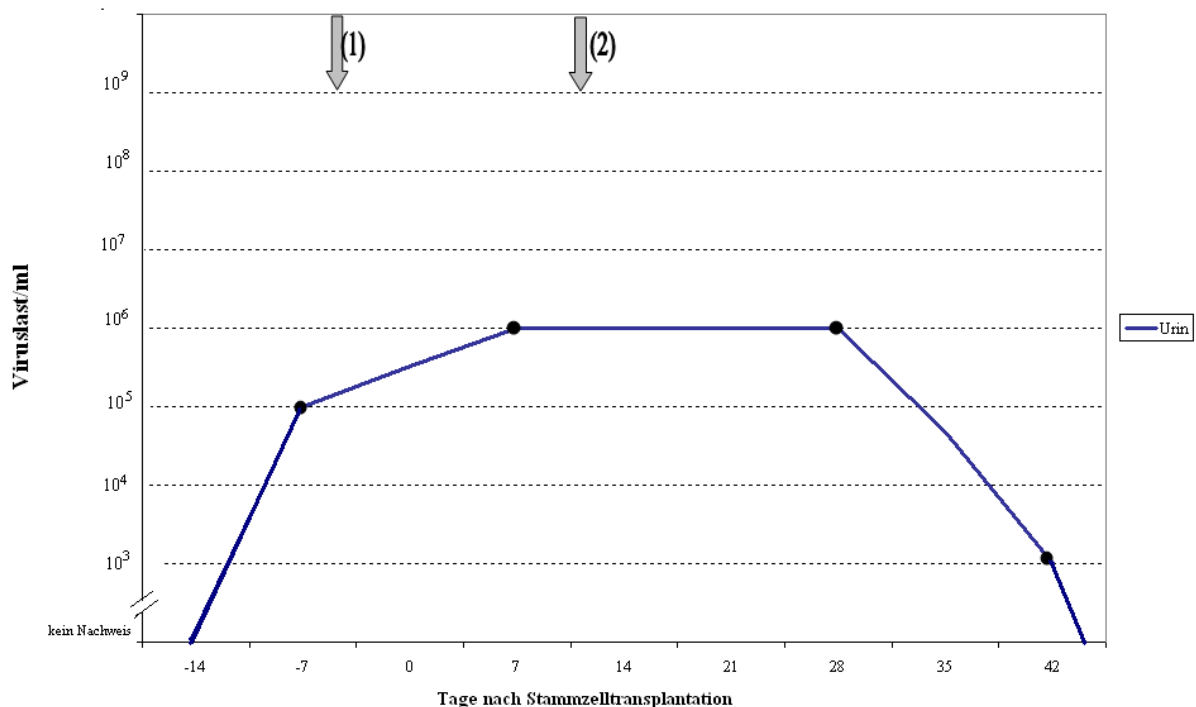
**Abb. 21: Verlauf der Viruslasten im Urin von Patient 403**

Legende: HSZT = hämatopoetische Stammzelltransplantation



#### 5.6.4 Kasuistik Patient 442

Es handelt sich um einen 4 jährigen Jungen der auf Grund eines Medulloblastoms WHO Grad IV autolog an der Uniklinik Jena transplantiert wurde. Der Patient erhielt 4 x 500 mg/m<sup>2</sup> KOF Carboplatin, 4 x 250 mg/m<sup>2</sup> KOF Etopophos und 4 x 2 mg MTX. Ein Volumen von 70 ml autologen Stammzellen wurde transfundiert. Nach der Transplantation stellte man fest, dass bei dem Patienten ein drainagepflichtiger Hydrocephalus vorlag. Dieser Hydrocephalus wurde durch die Entnahme des Ommaya-Reservoirs und die Neukonnection des ventrikulo-peritonealen Ableitungssystems therapiert. Zur zweiten autologen Transplantation wurde der Patient mit 3 x 1500 mg/m<sup>2</sup> KOF CY und 3 x 300 mg/m<sup>2</sup> KOF Thiopeta konditioniert. 60 ml autologe PBSZ wurden transfundiert. Es konnte bei dem Patienten eine aktive EBV-Infektion nachgewiesen werden, die mit Cymeven behandelt wurde. BKV im Urin konnten nachgewiesen werden. Eine HC entwickelte er nicht. In der folgenden Abbildung ist das Viruslastprofil des Patienten dargestellt:



**Abb. 22: Viruslastprofil im Urin Patient 442**

Legende: (1) erste autologe Transplantation  
(2) zweite autologe Transplantation

## 6 Diskussion

### 6.1 Inhaltliche Diskussion

#### 6.1.1 BKV-Häufigkeitsverteilungen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Häufigkeiten der BKV-Nachweise und deren Häufigkeitsverteilungen in einzelnen Untergruppen untersucht. Das BKV gehört zur Gruppe der Polyomaviren und ist der Struktur der JC-Viren (JCV) und des Simian-Virus 40 (SV40) sehr ähnlich (Miao und Dougherty 1977). Die Erstinfektion mit BKV erfolgt in den frühen Kindheitsjahren, im Alter von vier bis fünf Jahren. Sie ruft oft keine klinischen Symptome hervor. In manchen Fällen weisen die Kinder respiratorische Symptome auf, die nicht als schwerwiegend und hospitalisierungswürdig zu bezeichnen sind (Sundsford et al. 1994).

Die Durchseuchung mit einer durchgemachten symptomlosen BKV-Infektion ist hoch. Die Seroprävalenz beim Erwachsenen ist 70-90% (Leung et al. 2005b, Stolt et al. 2003, Brown et al. 1975). In anderen Studien wurde gefunden, dass die Seroprävalenz bis zum 10. Lebensjahr auf > 50% steigt (Funk et al. 2007, Hirsch 2005a). In der vorliegenden Arbeit konnte das BKV im Urin bei 79 von 147 Patienten nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 53,7%. Die transplantierten Patienten in der Studie waren im Mittel 12 Jahre und 4 Monate alt ( $SD = 6,5$ ;  $Min. = 0,1$ ;  $Max = 25,5$ ). Auffällig war, dass die BKV-positiven Patienten 3 Jahre und 2 Monate signifikant älter waren als die BKV-negativen Kinder. Es könnte angenommen werden, dass die jüngeren Kinder noch keine BKV-Infektion erlitten haben (Leung et al. 2006).

Die Anzahl der BKV-Nachweise im Urin stieg erst nach Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen auf 53,7% an. Vor Transplantation waren nur 28,5% der Patienten BKV-positiv im Urin. Da die untersuchten Patienten Kinder sind, könnte es sich beim Anstieg der BKV im Urin um eine Erstinfektion handeln, welche sich durch BK-Virurie äußert (Zhong et al. 2007). Diese Hypothese scheint allerdings durch den rapiden Anstieg der BK-Virurie nach Transplantation eher unwahrscheinlich.

Diese Vermehrung des BKV im Urin nach Transplantation könnte auch auf eine Reaktivierung durch die malignen Grunderkrankungen, die Immunsuppression, die Chemotherapie und die HSZT bei den Kindern zurückgeführt werden (Randhawa et al. 2004).

Diese Art von sekundärer Reaktivierung des BKV ist möglich, da es nach Erstinfektion im Urogenitaltrakt latent verweilt. Diese Patienten sind typischerweise bereits vor HSZT seropositiv (Egli et al. 2007, Hirsch und Steiger 2003). Weitere Publikationen unterstützten die Annahme der Reaktivierung des BKV. Sie fanden heraus, dass sich vermehrt BKV bei Patienten mit leichten Immundefiziten, wie Diabetes mellitus oder einer Schwangerschaft, nachweisen lassen. Auch Patienten mit AIDS zeigen eine gehäufte Ausscheidung von BKV im Urin (Behzad-Behbahani et al. 2004, Zhong et al. 2007). Weiter wird diese Annahme von Chakrabarti untermauert, welcher fand, dass eine BKV-Ausscheidung signifikant häufiger bei Patienten mit > Grad II GVHD zu finden war (Chakrabarti et al. 2003). Studien belegen, dass neben der Persistenz im renalen System auch zirkulierende Leukozyten und Knochenmarkszellen latente BKV aufweisen (Arthur und Shah 1989, Dörries et al. 1994, Dolei et al. 2000). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, dass durch Bluttransfusionen und durch HSZT latente BKV übertragen wurden. Die BKV reaktivieren im Empfänger und bedingen so die vermehrte BKV-Ausscheidung im Urin des Patientenkollektives. Unterstützt wird die Annahme der BKV-Übertragung durch Leung. Er und seine Mitarbeiter fanden, dass Spender und Empfänger, die eine HC entwickelten, den selben NCCR besaßen (Leung et al. 2005b).

Die in der vorliegenden Studie getesteten Kinder wurden weiterhin untersucht, ob eine vermehrte Ausscheidung des BKV nach allogener Transplantation zu finden war. Für die Patienten mit BKV-positivem Urinnachweis konnte keine signifikante Häufigkeitssteigerung bei allogener Transplantation festgestellt werden, auch wenn die allogene Transplantation 72,7% der Patienten ausmachte. Auch die Konditionierungsarten und Chemotherapeutika trugen nicht unterschiedlich häufig zur vermehrten Ausscheidung von BKV im Urin bei. Die für andere Viren gefundenen Gründe der Reaktivierung wie Kortikosteroide, Lymphopenie und Graft-versus-Host-Erkrankung konnten für BKV auch durch Erard nicht nachgewiesen werden (Erard et al. 2004). Eine erhöhte BKV-Reaktivierung wiesen Patienten unter voller Konditionierung im Vergleich zu reduzierten Konditionierungsregimen auf (Giraud et al. 2008). Allerdings handelt es sich in der Studie wiederum um Erwachsene.

Folglich sollten sich möglicherweise prospektive Studien anschließen, die auf Grundlage der Seroprävalenz der Empfänger und der Spender vor Beginn der Therapie, die BKV-Reaktivierung in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Patienten, Grunderkrankung, Transplantationsart, Stammzellquelle, Konditionierung und Chemotherapie beobachteten.

### 6.1.2 Hämorrhagische Zystitis

Die HC ist durch schmerzhafte Hämaturie und hämorrhagische Inflammation der Blasenmukosa gekennzeichnet. Sie manifestiert sich in Form von Mikro- und Makrohämaturien bis zur Koagelbildung in der Harnblase. Die HC kann zur Hydronephrose mit Niereninsuffizienz führen (Leung et al. 2005a, Erard et al. 2004). Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit der HC und deren zeitlicher Krankheitsverlauf untersucht. Die Diagnose der HC wurde für die Patienten nur gestellt, wenn keine gynäkologischen Blutungen vorlagen. Ein Zustand allgemeiner hämorrhagischer Diathese wurde vor Diagnosestellung ebenfalls ausgeschlossen. Die HC ist eine bekannte Komplikation nach Stammzelltransplantation, deren Inzidenz im getesteten Patientenkollektiv 12,9% (19 von 147) betrug. Die Inzidenz der HC-Patienten bei den allogenen transplantierten Patienten betrug 17,9% (19 von 106). Für die an HC erkrankten Patienten, welche jünger als 25 Jahre waren, wurden Inzidenzen von 40% (18 von 45) (El-Zimaity et al. 2004), 16,6% (Giraud et al. 2006) und 26,6% (Gorczynska et al. 2005) erhoben.

Allerdings entsprechen diese Ergebnisse nur den Inzidenzen unter den allogenen transplantierten Patienten. Mit einer Inzidenz von 13,1% (109 von 834) war die Inzidenz vergleichbar mit dem vorliegenden Ergebnis, obwohl die Patienten der Studie zwischen 0-77 Jahren alt waren. Bogdanovic und Mitarbeiter beschrieben eine Inzidenz von 19,3% (6 von 31). Allerdings handelte es sich bei seinem Patientenkollektiv um ein Gemisch von Erwachsenen und Kindern (Bogdanovic et al. 2004). Auch wurden mehr als doppelt so hohe Inzidenzen (28,8%) beschrieben, wobei es sich in dieser Studie wieder um ein gemischtes Patientenkollektiv handelte (Xu et al. 2007, Hassan et al. 2007). Nur Kinder beschrieb Cesaro, allerdings zeigte sich in der Studie nur eine Inzidenz von 3,6% (44 von 1218) (Cesaro et al. 2003). Die Unterschiede in der Ausprägung der Inzidenzen der HC sind möglicherweise durch die Art des Patientenkollektivs bedingt. Die unterschiedlichen Definitionen der HC in den Studien könnten ebenfalls Ursache sein.

Die Kinder in der vorliegenden Arbeit wurden nach Leung in die HC und deren Schweregrade eingeteilt (Leung et al. 2005a). Auffällig war, dass die meisten Patienten eine schwere HC entwickelten. Dies wurde auch in anderen Studien gefunden (Cesaro et al. 2003, Erard et al. 2005, Giraud et al. 2006, Hassan et al. 2007). Interessant war, dass nachweislich die Inzidenz der HC im Verlauf der Jahre abnahm (Hassan et al. 2007). Die Autoren führten dies auf die dosisangepasste Gabe von BU und CY zurück.

Der überwiegende Anteil der Patienten entwickelte die HC innerhalb der ersten vier Wochen nach Transplantation (Posttransplantationszystitis) (vgl. Abb. 7). Als medianer Zeitpunkt der HC wurde der Tag 33 nach Transplantation ermittelt. Vergleichbare Zeiträume wurden mit 35 Tagen (Seber et al. 1999, Hassan et al. 2007), 33 Tagen (Kondo et al. 1998), 22 Tagen (Childs et al. 1998), 24 Tagen (Lee et al. 2003), 33 Tage (Xu et al. 2007) und 37 Tagen nach Transplantation (Leung et al. 2001) ermittelt. Mit 56 Tagen nach HSZT (Hale et al. 2003) lagen die Ergebnisse über dem Durchschnitt. Auffällig ist, dass sich der zeitliche Beginn der HC in den Studien stark ähnelt. Die HC entsteht folglich meist in der Zeit des „Engraftments“ des Transplantats. Die Rekonstitution des Immunsystems und des hämatopoetischen Systems ist zu diesem Zeitpunkt in der Anfangsphase. Der geschwächte Organismus besitzt kaum Abwehrleistungen und ist empfänglich für jegliche Art von Infektionen.

Die HC dauerte im vorliegenden Patientenkollektiv im Durchschnitt 35,5 Tage (5 - 109 Tage). Auch hier wurden vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Dauer der HC mit 23 Tagen (Hassan et al. 2007), 35 Tagen (Xu et al. 2007), 31 Tage (Lee et al. 2003) und 21 Tagen (Childs et al. 1998) gefunden.

### **6.1.3 Zusammenhang von BKV und HC**

Bei allen 19 HC-Patienten (100%) konnte das BKV im Urin im Verlauf ihrer Grunderkrankung nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Häufigkeit der HC unter den BKV-positiven Patienten von 24%. 14 von 19 (73,7%) der HC-Patienten schieden zum Zeitpunkt der HC, BKV durch den Urin aus. Dieser starke Häufigkeitszusammenhang zwischen BKV und HC wurde auch in anderen Studien gefunden (Erard et al. 2004, Giraud et al. 2008, Vögeli et al. 1999). Auch fand man eine Assoziation von BKV und HC in HIV-Patienten (Barouch et al. 2002). Da sich das BKV auch in Patienten ohne HC nachweisen ließ, wurden die Proben quantifiziert. Die Viruslasthöchstwerte und die medianen Viruslasten der Patienten mit HC und ohne HC wurden verglichen (vgl. Abb. 10). Es stellte sich heraus, dass die quantifizierten HC-Patienten signifikant höhere Viruslasten aufwiesen als die Patienten ohne HC. Die HC-Patienten schieden median 1000fach höhere Viruslasten aus. Dies wurde in anderen Studien belegt (Giraud et al. 2008, Leung et al. 2001, Marinelli et al. 2007, Priftakis et al. 2003).

Von 3 Patienten mit HC wurden Viruslastprofile erstellt (vgl. Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21). In allen 3 Viruslastprofilen sind extreme Anstiege der Viruslasten zum Zeitpunkt der HC und im Verlauf der HC zu verzeichnen. Die Abb. 22 stellt im Vergleich dazu einen typischen Verlauf der Viruslasten bei einem Patienten ohne HC dar. Ein Viruslast-Peak ist nicht zu eruieren. Ähnliche Viruslastprofile konnte Leung aufzeigen (Leung et al. 2005c). Es handelte sich bei den Patienten der vergleichenden Studie allerdings um Erwachsene. Die Quantifizierung des BKV wurde mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detektor durchgeführt. Durch diese Unterschiede in den Studien könnten die hohen Viruslasten von bis  $10^{14}$  Kopien/ml bei Leung erklärt werden. Bei der Analyse der Patientenverläufe handelte es sich ausschließlich um retrospektive Betrachtungen. Somit nahm die Analyse keinen Einfluss auf die Therapieoptionen. Der Verlauf der Infektion lässt sich aber mittels Virus-DNA Quantifizierung retrospektiv gut verfolgen. Die Quantifizierung mit dem Light Cycler® ist kostenaufwendig und nicht für jeden Patienten sinnvoll. Jedoch könnte angenommen werden, dass der enorme Anstieg der BK-Viruslast Anhaltspunkt für die Entwicklung einer HC ist. Die Viruslastbestimmung im Urin könnte so vor allem in den ersten vier Wochen nach Transplantation im klinischen Alltag relevante Zusatzinformationen liefern. Dies ist besonders im Hinblick auf eine frühzeitige Behandlung von Bedeutung. Anhand eines stetig ansteigenden Verlaufs lässt sich theoretisch durch schnelles Eingreifen, z.B. durch Erhöhung der Infusionsmenge und Steigerung der Urinausscheidung mit Diuretika, eine manifeste Infektion vermeiden. Mit quantifizierten Verlaufskontrollen lassen sich möglicherweise die Therapieerfolge oder ein Abklingen der Infektion verfolgen (Marchetti et al. 2007, Watzinger et al. 2004).

Mit den Quantifizierungsergebnissen wurde weiterhin ein Grenzwert für Patienten mit HC im Vergleich zu Patienten ohne HC bestimmt. Als Grenze wurde die Viruslast von  $>1 \times 10^7$  Kopien/ml festgelegt. Dieser Grenzwert ergab eine Sensitivität für HC-Patienten von 93%. Allerdings war die Spezifität nur 59%, da 15 Patienten ohne HC ebenfalls über  $10^7$  Kopien/ml ausschieden. Mittels ROC-Analyse ergab sich kein besseres Ergebnis in der Spezifität. Nur auf Kosten der Sensitivität änderte sich die Spezifität. Die Häufigkeitsverteilungen zeigten sich signifikant unterschiedlich. Auch Leung et al stellten diese Art von Überlappung in der Höhe der BK-Viruslast fest. Der Grenzwert zwischen Patienten mit HC und ohne HC betrug in seiner Studie  $>10^{10}$  Kopien/ml. Leung quantifizierte die BKV mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detektor der Firma PE Biosystems, Foster City, CA und es handelte sich in dieser Studie um Erwachsene. Hierdurch lässt sich möglicherweise der höhere Grenzwertansatz erklären (Leung et al. 2001).

Weiterhin wurden die Viruslasten der HC-Patienten in Bezug auf deren Schweregrade untersucht. Grad 1 und 2 wurden zu moderater HC und Grad 3 und 4 zu schwerer HC zusammengefasst. Auffällig war, dass sowohl die Viruslasthöchstwerte als auch die medianen Viruslasten der Patienten mit schwerer HC signifikant höher waren als die der Patienten ohne HC. Die schwere HC unterschied sich aber nicht von den Patienten mit moderater HC.

Es wurden vereinzelt BKV im Blut nachgewiesen. 57,8% der Patienten mit HC und nur 8% der Patienten ohne HC waren BKV-positiv im Plasma. Es ergab sich eine hochsignifikante Häufigkeitssteigerung für die Patienten mit HC. Die Patienten mit HC waren vermehrt positiv für BKV im Plasma (Bereich: 1 Probe – 11 Proben). Interessant war zu sehen, dass vor allem die Patienten mit schwerer HC eine höhere Anzahl an positiven BKV-PCR-Produkten aufwiesen. Die Vermutung liegt nahe, dass je schwerer die HC ist, desto systemischer die Infektion mit BKV ist. Diese Hypothese ist allerdings auch auf Grund der geringen Fallzahl durch weitere prospektive Studien zu untersuchen. Um weitere Aussagen über die HC-Patienten und BKV im Blut treffen zu können, wurden auch diese quantifiziert. Da nur HC-Patienten mehr als 2 positive PCR-Produkte aufwiesen, wurden keine HC-negativen Patienten quantifiziert. In anderen Studien gelang die Mehrfachquantifizierung des Plasmas von Nicht-HC-Patienten. Es handelte sich um Erwachsene in der Studie. Allerdings konnte auch hier kein signifikanter Viruslastanstieg im Plasma der HC-Patienten nachgewiesen werden, auch nicht wenn zur selben Zeit ein signifikanter Anstieg der Urinviruslast zu verzeichnen war (Wong et al. 2007a).

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Viruslastvergleiche der Plasmen in Bezug auf die Schweregrade der HC beschränkt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (vgl. Abb. 11). Dies könnte auf die zu geringe Fallzahl zurückzuführen sein. Zu dieser Untersuchung wurden keine vergleichbaren Ergebnisse anderer Studien gefunden. Folglich sollte in den nachfolgenden Studien mehr Wert auf die Kontrolle möglicher BK-Virämien gelegt werden.

Die Existenz von BKV-Reaktivierung in Patienten ohne HC veranlasste zur Annahme, dass es neben den BKV weitere Ursachen geben muss, die die Entstehung einer HC begünstigen (Azzi et al. 1994).

Die Adenoviren sind neben den BKV als Ursache für die HC publiziert worden (Fanourgiakis et al. 2005, Akiyama et al. 2001). Auch dem SV40 wurde ein Zusammenhang mit der HC zugeschrieben (Comar et al. 2004). In einer Studie wurden Fälle vorgestellt, welche das CMV in Zusammenhang mit der BKV-Reaktivierung brachten (Bielorai et al. 2001). Den 5 HC-Patienten, die keine BKV im Urin zum Zeitpunkt der HC aufwiesen, konnten ebenfalls keine einheitlichen Infektionen nachgewiesen werden. 2 von 5 Patienten hatten Adenoviren im Urin. Bei 3 von 5 Patienten konnte eine Bakteriurie nachgewiesen werden. Einer der Patienten schied weder Viren noch Pilze noch Bakterien durch den Urin aus. Inwiefern die Viren und Bakterien einen Einfluss auf die Entstehung der HC in der vorliegenden Studie nahmen, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden.

Es wurden klinisch-pathologische Parameter in Zusammenhang mit den HC-Patienten gesetzt. Es wurde ihre Potenz als Risikofaktor untersucht. Um die BKV in Einklang mit den potentiellen Risikofaktoren zu bringen, wurden die medianen Viruslasten und die Viruslasthöchstwerte innerhalb der HC-Gruppen mit und ohne potentiellen Risikofaktor analysiert.

#### **6.1.3.1 Geschlecht und Alter**

10,5% der transplantierten Mädchen entwickelten eine HC. Unter den Mädchen, welche BKV ausschieden, waren es 18%. 14,4% der transplantierten Jungen zeigten eine HC. Es wurde keine signifikante Häufigkeitssteigerung für Jungen gefunden. In der Risikofaktorenanalyse wurde das männliche Geschlecht ebenfalls nicht als signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer HC gesehen. Als nicht signifikanter Risikofaktor wurde das männliche Geschlecht auch in anderen Studien publiziert (Cheuk et al. 2007, Childs et al. 1998, Gorczynska et al. 2005, Lee et al. 2003, Seber et al. 1999, Tsuboi et al. 2003). Aber es existieren auch Studien, in denen die männlichen Patienten als signifikanter Risikofaktor gefunden wurde (Asano et al. 2003, Cesaro et al. 2003, Hale et al. 2003). Diese unterschiedlichen Literaturergebnisse bedürfen somit erneuter Abklärung in größeren prospektiven Studien.



Um das Geschlecht der HC Patienten in Bezug zu den BKV mit der HC zu setzen, wurden die medianen Viruslasten (vgl. Abb. 13) und Viruslasthöchstwerte berechnet. Interessanterweise unterschieden sich die männlichen und weiblichen Patienten innerhalb ihrer HC- oder Nicht-HC-Gruppe nicht signifikant voneinander, weder in Bezug auf die medianen Viruslasten, noch in Bezug auf Viruslasthöchstwerte. Die männlichen und weiblichen HC-Patienten imponierten allerdings durch signifikant höhere Viruslasten als die Patienten ohne HC. Somit ist davon auszugehen, dass die HC auf die BK-Viruslast zurückzuführen ist, aber nicht vom Geschlecht beeinflusst wird.

Die Betrachtung des Alters der Patienten ergab viele interessante Ergebnisse. So waren die Patienten mit HC um 3 Jahre und 6 Monate signifikant älter als die Patienten ohne HC. 15 von 19 HC-Patienten waren >12 Jahre. Nur 4 von 19 HC-Patienten waren < 12 Jahre. Auf Grund dieser Ergebnisse schuf man den Risikofaktor Alter >12 Jahre. In der univariaten binär logistischen Regressionsanalyse war der Risikofaktor als signifikant eingestuft. Ein Alter von >12 Jahren steigert das Risiko an einer HC zu erkranken um den Faktor 3,275. In der multivariaten Risikofaktoranalyse zeigte sich das Alter >12 Jahre als signifikanter unabhängiger Risikofaktor. In anderen Studien wurde ebenfalls festgestellt, dass jüngere Patienten weniger häufig an HC erkrankten. So fanden Kondo und sein Mitarbeiter, dass Kinder >7 Jahre häufiger an HC litten als Kinder unter 7 Jahre (Kondo et al. 1998). In einer anderen Arbeit wurde dargestellt, dass Patienten über > 8 Jahre ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer HC haben (Cheuk et al. 2007). Studien, welche eine HC in einer Erwachsenenengruppe oder in einer gemischten Studienpopulation untersuchten, stuften ein Alter unter 25 Jahre als signifikanter Risikofaktor ein (El-Zimaity et al. 2004, Seber et al. 1999, Xu et al. 2007). Mit Hilfe der Literatur könnte eine Gruppe von Patienten zwischen 7 und 25 Jahren definiert werden, die ein erhöhtes Risiko aufweist, eine HC zu entwickeln. Um den Einfluss des Alters auf die BK-Viruslast für die Patienten mit HC zu eruieren, wurden die medianen Viruslasten und Viruslasthäufigkeitsprofile bestimmt. Die Viruslasten im Urin der HC-Patienten über oder unter 12 Jahre unterschieden sich in den medianen Viruslasten signifikant von den Patienten ohne HC. Einen Unterschied in den Viruslasten konnte für die Kinder über 12 Jahre mit HC gegenüber den HC-Patienten unter 12 Jahre nicht verzeichnet werden (vgl. Abb. 13). Auffällig war allerdings, dass die Nicht-HC-Patienten, wenn sie über 12 Jahre waren signifikant höhere Viruslasten ausschieden als Patienten <12 Jahre. Es könnte davon ausgegangen werden, dass die Patienten über 12 Jahre vermehrt BKV im Urin ausscheiden und dadurch eine HC-Entstehung begünstigen.

### 6.1.3.2 Konditionierung

Die Patienten in der vorliegenden Arbeit wurden neben anderen Chemotherapien mit BU und CY konditioniert (vgl. Abb. 2). Es wurde festgestellt, dass BU signifikant häufiger in der HC-Gruppe als in der Patientengruppe ohne HC verwendet wurde. Patienten, die mit CY konditioniert wurden, erkrankten nicht häufiger an einer HC. Jedoch die Kombination aus BU/CY steigerte das Auftreten der HC signifikant. Wenn eine HC auftrat, und BU und CY in der Konditionierung verwendet wurde, dann immer in Kombination. Auf der Grundlage dieser Daten wurden CY und BU getrennt, als auch in Kombination in die Risikofaktoranalyse eingeschlossen. So konnte genauer untersucht werden, welches der beiden Chemotherapeutika das HC-Risiko signifikant steigert.

Wir untermauerten die Ergebnisse einiger Studien, die BU ebenfalls als signifikanten Risikofaktor in der univariaten binär logistischen Regressionsanalyse fanden bzw. einen Zusammenhang zwischen der Gabe von BU und HC herstellten (Kondo et al. 1998, Seber et al. 1999, Leung et al. 2002, Hassan et al. 2007, Peinemann et al. 2000). BU steigert das Risiko an einer HC zu erkranken um den Faktor 3,514.

CY wurde in der univariaten Regressionsanalyse nicht als signifikant gefunden. Dies widersprach den Ergebnissen einiger Studien (Cheuk et al. 2007, Hu et al. 2008, Tsuboi et al. 2003), bestätigten aber wiederum andere (Seber et al. 1999). Alle Patienten in der vorliegenden Studie wurden neben der Gabe von CY auch mit Mesna behandelt. Dass die Gabe von CY nicht als signifikanter Risikofaktor gefunden wurde, könnte dem protektiven Effekt von Mesna auf die Blase zugeschrieben werden (Morais et al. 1999).

In der univariaten und multivariaten binär logistischen Regressionsanalyse war die Kombination BU/CY ein signifikanter Risikofaktor. Die Kombination steigert das Risiko an einer HC zu erkranken auf den Faktor 4,935. Die multivariate Regressionsanalyse zeigte außerdem, dass die Gabe von BU/CY der wichtigste Risikofaktor war. BU hingegen zeigte sich nicht als unabhängiger Risikofaktor. Auf Grund dieses Ergebnisses könnte angenommen werden, dass die Gabe von BU zwar das Risiko steigert an einer HC zu erkranken, jedoch erst durch die Kombination von CY die Erkrankungswahrscheinlichkeit potenziert und unabhängig von den anderen Risikofaktoren wird. Möglicherweise liegt auch ein synergetischer Effekt von CY und BU vor. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien beschrieben (Peinemann et al. 2000, Tsuboi et al. 2003). Um einen Zusammenhang mit der Reaktivierung mit BKV herzustellen, wurden die medianen Viruslasten und die Viruslasthöchstwerte im Urin in den Gruppen mit HC und ohne HC in Anbetracht der

durchgeführten Chemotherapie untersucht (vgl. Abb. 15). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in den HC-Patienten, welche mit BU/CY-Kombination und ohne BU/CY-Kombination transplantiert worden waren, gefunden. Es kann davon ausgegangen werden, dass in der vorliegenden Studie die Höhe der Viruslasten im Urin nicht von der Gabe der Chemotherapie, sondern von der HC abhängig ist.

Weiterhin wurden die HC-Patienten auf die Gabe von ATG untersucht. Es stellte sich im Patientenkollektiv heraus, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen ATG und der Entstehung von HC gab. Auch stellte sich die Gabe von ATG nicht als Risikofaktor in der univariaten binär logistischen Regressionsanalyse dar. Wir bestätigten somit publizierte Ergebnisse (Cheuk et al. 2007, El-Zimaity et al. 2004, Hassan et al. 2007 Kondo et al. 1998). Allerdings widersprachen wir auch einigen Studien (Hale et al. 2003, Tsuboi et al. 2003, Xu et al. 2007).

Weiterhin wurden die Patienten im Zusammenhang mit der Gabe von ATG in Bezug auf die Viruslasten untersucht. Es wurde gefunden, dass die medianen Viruslasten aller Patienten ohne HC in der Gruppe der ATG-Behandelten signifikant höher waren (vgl. Abb. 16). Es könnte davon ausgegangen werden, dass eine ATG-Gabe die Viruslastausscheidung im Urin steigert und so eine HC begünstigt. Allerdings sind die Patienten mit HC und ATG nicht signifikant von den Patienten mit HC ohne ATG-Gabe zu unterscheiden. Da ATG auch nicht als Risikofaktor einzustufen war, könnte davon ausgegangen werden, dass ATG zwar Einfluss auf die Viruslastausscheidung im Urin hat und möglicherweise eine HC begünstigt, aber die HC dadurch nicht bedingt.

Die Patienten in der vorliegenden Studie wurden neben den Chemotherapeutika auch mittels Radiatio in Kombination mit Chemotherapie konditioniert. Für das vorliegende Patientenkollektiv wurde kein signifikanter Zusammenhang von HC und Radiatio hergestellt. Die Gabe von Chemotherapie und TBI war kein signifikanter Risikofaktor in der binär logistischen Regression. Somit entsprachen die Werte den Ergebnissen publizierter Studien. Weiterhin wurden die Patienten auf den Zusammenhang von Viruslasten im Urin und der Konditionierung mit TBI und Chemotherapie in Kombination untersucht. Es stellte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Viruslastausscheidung in den Gruppen mit HC dar (vgl. Abb. 14). Es kann davon ausgegangen werden, dass die TBI in Kombination mit Chemotherapie keinen Einfluss auf die Höhe der Viruslastausscheidung und die HC hat.

### 6.1.3.3 Transplantationsart

Die HC trat bei 18 von 19 Patienten nach einer allogenen Transplantation auf. 1 Patient entwickelte bereits vor allogener Transplantation eine HC. Die Inzidenz der HC unter den allogenen transplantierten Patienten betrug 17,9%. Des Weiteren wurde die Höhe der BK-Viruslast im Urin bei den allogenen und den autolog transplantierten Patienten untersucht. Alle medianen Viruslasten der allogenen transplantierten Gruppen mit HC unterschieden sich signifikant von den medianen Viruslasten der autolog transplantierten Patienten (vgl. Abb. 17). Die Patienten ohne HC, welche allogenen transplantiert worden waren, zeigten im Trend 100-fach höhere Viruslasten. Es könnte davon ausgegangen werden, dass durch die vermehrte Immunsuppression und erhöhte Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation die BKV reaktivieren. Das führt zur Annahme, dass die allogene Transplantation die BK-Viruslasten ansteigen lässt, die BKV eine Infektion der Blasenmukosa verursacht und folglich zur HC führt. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass die allogene Transplantation die Blasenmukosa schädigt und so erst den BKV die Möglichkeit gibt, die Blase zu infizieren. Auch andere Studien fanden einen starken Zusammenhang von allogener Transplantation und HC heraus (Arthur et al. 1986, Cheuk et al. 2007, Cesaro et al. 2003, Kondo et al. 1998, Leung et al. 2005a). Es wird eine alloimmune Reaktion des Transplantats in der Zeit der Rekonstitution der Hämatopoese angenommen. Da aber nicht alle Patienten nach allogener Transplantation eine HC entwickelten, muss es noch weitere Faktoren geben, welche die Entstehung einer HC begünstigen.

Bei der Betrachtung der Viruslasten innerhalb der allogenen transplantierten Patienten war auffällig, dass die medianen Viruslasten im Urin der Patienten ohne HC nicht signifikant von den Viruslasten der Patienten mit moderater HC zu unterscheiden waren. Die Patienten mit schwerer HC hingegen schieden signifikant höhere Viruslasten aus. Es könnte angenommen, dass die Höhe der Viruslast sich auf die Schweregradentwicklung auswirkt, wenn weitere Risikofaktoren die Viruslastausscheidung potenzieren.

Die transplantierten Patienten wurden nochmalig in Bezug auf die Stammzellquelle (fremd/nicht fremd) untersucht. Eine HC entwickelte sich signifikant häufiger, wenn mit Stammzellquellen eines Fremdspenders transplantiert worden war. In die binär logistische Regressionsanalyse wurde die allogene Transplantation nicht als Risikofaktor eingeschlossen, da sie mit 100% eindeutige Zusammenhänge mit der HC aufwies. So vermieden wir Fehler in der multivariaten Analyse und konnten die anderen Risikofaktoren besser beurteilen. Die Transplantation mit Stammzellen eines Fremdspenders wurde in die Risikofaktoranalyse

eingeschlossen. Dabei stellte sich die Fremdspende als signifikanter Risikofaktor für die HC heraus. Die Fremdspende steigert das Risiko an einer HC zu erkranken um den Faktor 3,309. In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die Stammzellen eines Fremdspenders kein unabhängiger Risikofaktor sind, sondern von weiteren Risikofaktoren abhängen. Die Fremdspende als signifikanter Risikofaktor wurde auch in anderen Studien publiziert (Hale et al. 2003, Giraud et al. 2008, Giraud et al. 2006). Erklärt werden könnte dies durch die noch aggressivere Therapie vor Transplantation, was dazu führen kann, dass die Blasenmukosa geschädigt wird. Auch könnte die verstärkte Immunsuppression eine Rolle spielen. Dies wurde auch in Studien angenommen, die fanden, dass HLA-nicht-identische Spenden vermehrt eine HC auslösten (Giraud et al. 2008).

Des Weiteren wurden die Viruslasten hinsichtlich der Spendertypen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Viruslasten im Urin der HC-Patienten, die mit Stammzellen eines Fremdspenders transplantiert worden waren, nicht signifikant höher waren als die Viruslasten der HC-Patienten, die mit Stammzellen eines Familienspenders transplantiert worden waren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Fremdspende, zwar häufiger eine HC entstehen lässt, aber die BKV-Infektion nicht verschlimmert.

#### **6.1.3.4 Klinischer Verlauf**

Die Mehrheit der Patienten, welche an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin in Jena transplantiert wurden, wurden auf Grund einer malignen Grunderkrankung transplantiert. 14% von diesen Patienten entwickelten eine HC. 7,7% der Kinder, die auf Grund einer nichtmalignen Grunderkrankung transplantiert worden waren, entwickelten ein HC. Die Häufigkeitsverteilungen unterschieden sich nicht signifikant. Auch in der univariaten binär logistischen Risikofaktorenanalyse zeigte sich die maligne Grunderkrankung nicht als signifikanter Risikofaktor. Mit den Ergebnissen bestätigen wir die Ergebnisse anderer Studien, welche die maligne Grunderkrankung ebenfalls nicht als signifikanten Risikofaktor einstufen (Kondo et al. 1998, Lee et al. 2003, Seber et al. 1999,).

Es zeigten in der vorliegenden Arbeit 12 von 19 HC-Patienten (63,1%) im klinischen Verlauf nach Transplantation eine akute Graft-versus-Host-Erkrankung. Die Frequenz der aGVHD bei den Patienten mit HC war signifikant höher als bei den Patienten ohne HC. 6 von 12 Patienten zeigten bereits vor HC eine aGVHD und 6 von 12 Patienten erstmalig nach der Diagnose HC. Auch andere Studien fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen aGVHD und HC, z.B. dass Posttransplantationszystitis häufiger mit aGVHD assoziiert ist als Prätransplantationszystitis (Lee et al. 2003). Es gab aber auch Studien, die keinen Zusammenhang zwischen aGVHD und HC herstellen konnten (Giraud et al. 2006). Weitere Studien schlossen die GVHD in deren Risikofaktorenanalysen ein. Das Auftreten einer HC wurde erhöht durch die aGVHD Grad II-IV um den Faktor 2,72 (Hassan et al. 2007); um 2,56 (Seber et al. 1999) und um 2,75 (Xu et al. 2007). Die aGVHD wurde in der vorliegenden Studie nicht in die Risikofaktoranalyse eingeschlossen, da sich die aGVHD nicht eindeutig nur vor der HC äußerte und so für uns keinen reinen Risikofaktor darstellte. Die GVHD steht bekanntlich in engem Zusammenhang mit immunsuppressiven Zuständen der Patienten und könnte so möglicherweise zu einer vermehrten Reaktivierung der BKV führen. In unserer Studie stand die Frequenz der aGVHD in signifikantem Zusammenhang mit der BKV-Ausscheidung nach Transplantation. Weiterhin wurde der Zusammenhang der Viruslast bei HC-Patienten und nicht HC-Patienten in Anbetracht des Vorhandenseins einer aGVHD untersucht. Mit signifikant höheren Viruslasten (sowohl im medianen, als auch im Höchstwertbereich) zeigten sich die Patienten, welche sowohl HC als auch aGVHD positiv waren. Auch Bogdanovic fand heraus, dass eine aGVHD und eine Viruslast über  $10^6$  Kopien/ml den stärksten Zusammenhang mit HC zeigten (Bogdanovic et al. 2004). Allerdings bedürfen die Ergebnisse weiterer Abklärung, da sich die HC-Patienten mit und ohne aGVHD nicht signifikant voneinander unterschieden. Bekanntlich steigert die GVHD das Infektionsrisiko und könnte somit den BKV die Möglichkeit zur Infektion der Blase gegeben haben, was anschließend in einer HC mündete. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Häufung der aGVHD bei den HC-Patienten damit zusammenhängt, dass das Urothel der Blase als Targetorgan für die aGVHD eine Rolle spielt und sich die Erkrankungen so untereinander bedingen (Waller 2007).

## 6.2 Methodische Diskussion

Um bessere Aussagen über die BKV treffen zu können, wurden von 51 Patienten Urinproben mittels Q-PCR hinsichtlich der BK-Viruslast analysiert. Die Proben, welche quantifiziert wurden, waren in der qualitativen PCR positiv. Es wurden nur Proben von Patienten verwendet, welche mehr als zwei positive qualitative PCR-Produkte aufwiesen. Somit wurde eine bessere Möglichkeit geschaffen, die Patienten vergleichbar zu machen. Auch konnten so die Viruslasthöchstwerte und mediane Viruslasten berechnet werden. Die Viruslasthöchstwerte und medianen Viruslasten gaben wiederum bessere Ansätze zum Vergleich der Ergebnisse.

Die Probeneluate mussten für die Light Cycler® PCR nicht erneut aufbereitet werden. Allerdings wurden die Proben bei -80°C über die Jahre eingefroren und zur Quantifizierung aufgetaut. Aus diesem Vorgang könnten sich Fehler in den Quantifizierungsergebnissen ergeben haben. Das Virus könnte durch das Auftauen Schaden im Genom genommen haben, wodurch es nicht mehr quantifiziert werden konnte.

Des Weiteren ist zu betrachten, dass die Urinproben zu unterschiedlichsten Tageszeiten und Hydrierungszuständen der Patienten entnommen wurden. Die Konzentration des Urins könnte einen Einfluss auf die Höhe der Viruslast gehabt haben.

Um die Ergebnisse zu untermauern sollten in einer prospektiv angelegten Studie die Quantifizierungen der BKV durchgeführt werden. Um alle Patienten einschließen zu können, sollten die BKV-Proben kontinuierlich in gleichen Abständen und festgelegten Zeiten entnommen werden.

## 7 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Annahme, dass es sich bei der Entstehung der HC bei Kindern nach Stammzelltransplantation um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Folgende Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit gefunden:

- Die HC tritt vor allem in den ersten vier Wochen nach HSZT auf.
- CY potenziert den Effekt von BU auf die Blase.
- Eine aGVHD ist frequentiell häufiger mit einer HC assoziiert.
- Der Zusammenhang der HC mit den BKV ist hochsignifikant.
- Die BK-Viruslasten steigen signifikant bei einer HC-Erkrankung.
- Bei Kindern > 12 Jahre und bei Gabe von ATG steigen die Viruslasten signifikant, auch wenn keine HC vorliegt.
- Die Viruslastprofile der beschriebenen Patienten steigen eindeutig an, wenn es zum Ausbruch einer HC kommt.

Die Quantifizierung von BKV ist sehr kostenaufwendig und beansprucht Zeit. Allerdings ist durch die Studie gezeigt worden, dass mit Hilfe der Viruslast und einem Risikoprofil des Patienten, die HC frühzeitig erkannt werden könnte. Dieses Risikoprofil sollte sich zusammensetzen aus:

- Gabe von BU und BU/CY
- allogene Transplantation mit Stammzellen eines Fremdspenders
- Alter > 12 Jahre
- Obwohl nicht als Risikofaktoren deklariert, sollten berücksichtigt werden: Gabe von ATG, da es die Viruslast steigert und Auftreten einer aGVHD.

Die Viruslastbestimmung im Urin könnte so vor allem in den ersten vier Wochen nach Transplantation im klinischen Alltag relevante Zusatzinformationen liefern. Dies ist besonders im Hinblick der frühzeitigen Behandlung von Bedeutung. Mit quantifizierten Verlaufskontrollen lassen sich möglicherweise Therapieerfolge oder ein Abklingen der Infektion verfolgen.

Alle Ergebnisse sollten durch prospektiv angelegte Studien untermauert werden. Hierbei sollten die Patienten, unter Betrachtung der Risikofaktoren, regelmäßig auf BKV im Urin und Blut, sowohl qualitativ als auch quantitativ, getestet werden.



## 8 Literaturverzeichnis

- Adès L, Guardiola P, Sociè G. 2002. Second malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: new insight and current problems. *Blood Rev*, 16 (2):135-146.
- Akiyama H, Kurosu T, Sakashita C, Inoue T. 2001. Adenovirus is a key pathogen in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*, 32 (9):1325-1330.
- Aktories K, Unger C. 2005. Mittel zu Behandlung von Tumoren - Tumorchemotherapie. In: Aktories K, Hrsg. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München Jena: Urban & Fischer, 921-959.
- Ambinder RF. 1999. Epstein-Barr Virus Infections. In: Forman SJ, Hrsg. Hematopoietic Cell Transplantation. Oxford London Edinburgh Carlton: Blackwell Science, Inc., 607-617.
- Appelbaum FR. 2003. Knochenmark-und Stammzelltransplantation. In: Dietel M, Hrsg. Harrisons Innere Medizin 1. Berlin Leiben: ABW Wissenschaftsverlag, 817-822.
- Arthur RR, Shah KV. 1989. Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. *Prog Med Virol*, 36:42-61.
- Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. 1986. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med*, 315 (4):230-234.
- Arvin MA. 1999. Varizella-Zoster Virus Infection. In: Forman SJ, Hrsg. Hematopoietic Cell Transplantation. Oxford London Edinburgh Carlton: Blackwell Science, Inc., 591-606.
- Asano Y, Kanda Y, Ogawa N, Sakata-Yanagimoto M, Nakagawa M, Kawazu M, Goyama S, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. 2003. Male predominance among Japanese adult patients with late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 32 (12):1175-1179.
- Atkinson K, Horowitz M, Gale R, van Bekkum D, Gluckman E, Good R, Jacobsen N, Kolb H, Rimm A, Ringdén O. 1990. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*, 75 (12):2459-2464.

- Avigan D, Pirofski LA, Lazarus HM. 2001. Vaccination against infectious disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 7 (3):171-183.
- Azzi A, Fanci R, Bosi A, Ciappi S, Zakrzewska K, de Santis R, Laszlo D, Guidi S, Saccardi R, Vannucchi AM. 1994. Monitoring of polyomavirus BK viruria in bone marrow transplantation patients by DNA hybridization assay and by polymerase chain reaction: an approach to assess the relationship between BK viruria and hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant*, 14 (2):235-240.
- Barouch DH, Faquin WC, Chen Y, Koralnik IJ, Robbins GK, Davis BT. 2002. BK virus-associated hemorrhagic cystitis in a Human Immunodeficiency Virus-infected patient. *Clin Infect Dis*, 35 (3):326-329.
- Beck JF, Klingebiel T, Kreyenberg H, Schaudt A, Wölle W, Niethammer D, Bader P. 2002. [Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism]. *Klin Padiatr*, 214 (4):201-205.
- Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Khoo SH. 2004. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol*, 29 (4):224-229.
- Bielorai B, Shulman LM, Rechavi G, Toren A. 2001. CMV reactivation induced BK virus-associated late onset hemorrhagic cystitis after peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 28 (6):613-614.
- Bindl L, Nicolai T. 2005. [Management of septic shock and acquired respiratory distress syndrome in pediatric cancer patients]. *Klin Padiatr*, 217 Suppl 1:S130-142.
- Bogdanovic G, Priftakis P, Giraud G, Kuzniar M, Ferraldeschi R, Kokhaei P, Mellstedt H, Remberger M, Ljungman P, Winiarski J, Dalianis T. 2004. Association between a high BK virus load in urine samples of patients with graft-versus-host disease and development of hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol*, 42 (11):5394-5396.
- Brown P, Tsai T, Gajdusek DC. 1975. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol*, 102 (4):331-340.

- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. 1989. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (10):3828-3832.
- Burns WA. 1999. Herpes Simplex Virus Infections. In: Forman SJ, Hrsg. *Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford London Edinburgh Carlton: Blackwell Science, Inc, 584-590.
- Cesaro S, Brugiolo A, Faraci M, Uderzo C, Rondelli R, Favre C, Zecca M, Garetto G, Dini G, Pillon M, Messina C, Zanesco L, Pession A, Locatelli F. 2003. Incidence and treatment of hemorrhagic cystitis in children given hematopoietic stem cell transplantation: a survey from the Italian association of pediatric hematology oncology-bone marrow transplantation group. *Bone Marrow Transplant*, 32 (9):925-931.
- Chakrabarti S, Osman H, Collingham K, Milligan DW. 2003. Polyoma viruria following T-cell-depleted allogeneic transplants using Campath-1H: incidence and outcome in relation to graft manipulation, donor type and conditioning. *Bone Marrow Transplant*, 31 (5):379-386.
- Cheuk DK, Lee TL, Chiang AK, Ha SY, Lau YL, Chan GC. 2007. Risk factors and treatment of hemorrhagic cystitis in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int*, 20 (1):73-81.
- Childs R, Sanchez C, Engler H, Preuss J, Rosenfeld S, Dunbar C, van Rhee F, Plante M, Phang S, Barrett AJ. 1998. High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant*, 22 (9):889-893.
- Choo SY. 2007. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*, 48 (1):11-23.
- Comar M, D'Agaro P, Andolina M, Maximova N, Martini F, Tognon M, Campello C. 2004. Hemorrhagic cystitis in children undergoing bone marrow transplantation: a putative role for simian virus 40. *Transplantation*, 78 (4):544-548.
- Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM. 2000. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol*, 81 (Pt 8):1967-1973.

- Dörries K, Vogel E, Günther S, Czub S. 1994. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology*, 198 (1):59-70.
- Down JD, Tarbell NJ, Thames HD, Mauch PM. 1991. Syngeneic and allogeneic bone marrow engraftment after total body irradiation: dependence on dose, dose rate, and fractionation. *Blood*, 77 (3):661-669.
- Ebell W. 2006. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. In: Gadner H, Gaedicke G, Hrsg. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Heidelberg: Springer Verlag, 66-85.
- Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, Leuenberger D, Gosert R, Hirsch HH. 2007. Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant*, 22 Suppl 8:viii72-viii82.
- Eibl B, Schwaighofer H, Nachbaur D, Marth C, Gächter A, Knapp R, Böck G, Gassner C, Schiller L, Petersen F, Niederwieser D. 1996. Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer. *Blood*, 88 (4):1501-1508.
- El-Zimaity M, Saliba R, Chan K, Shahjahan M, Carrasco A, Khorshid O, Caldera H, Couriel D, Giralt S, Khouri I, Ippoliti C, Champlin R, de Lima M. 2004. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: donor type matters. *Blood*, 103 (12):4674-4680.
- Erard V, Storer B, Corey L, Nollkamper J, Huang ML, Limaye A, Boeckh M. 2004. BK virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients: frequency, risk factors, and association with postengraftment hemorrhagic cystitis. *Clin Infect Dis*, 39 (12):1861-1865.
- Erard V, Kim HW, Corey L, Limaye A, Huang ML, Myerson D, Davis C, Boeckh M. 2005. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 106 (3):1130-1132.
- Eyrich M, Leiler C, Lang P, Schilbach K, Schumm M, Bader P, Greil J, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Schlegel P. 2003. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34<sup>+</sup> peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant*, 32 (4):379-390.

- Fanourgiakis P, Georgala A, Vekemans M, Triffet A, De Bruyn JM, Duchateau V, Martiat P, De Clercq E, Snoeck R, Wollants E, Rector A, Van Ranst M, Aoun M. 2005. Intravesical instillation of cidofovir in the treatment of hemorrhagic cystitis caused by adenovirus type 11 in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis*, 40 (1):199-201.
- Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. 1999. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 5 (6):347-356.
- Fu S, Liesveld J. 2000. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev*, 14 (4):205-218.
- Fu SQ, Abboud CN, Brennan JK, Ifthikharuddin JJ, Nichols D, Liesveld JL. 2002. Impact of mobilized blood progenitor cell quality determined by the CFU-GM/CD34<sup>+</sup> ratio on rapid engraftment after blood stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*, 28 (3):315-321.
- Funk G, Gosert R, Hirsch H. 2007. Viral dynamics in transplant patients: implications for disease. *Lancet Infect Dis*, 7 (7):460-472.
- Funk GA, Steiger J, Hirsch HH. 2006. Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J Infect Dis*, 193 (1):80-87.
- Giraud G, Bogdanovic G, Priftakis P, Remberger M, Svahn B, Barkholt L, Ringden O, Winiarski J, Ljungman P, Dalianis T. 2006. The incidence of hemorrhagic cystitis and BK-viruria in allogeneic hematopoietic stem cell recipients according to intensity of the conditioning regimen. *Haematologica*, 91 (3):401-404.
- Giraud G, Priftakis P, Bogdanovic G, Remberger M, Dubrulle M, Hau A, Gutmark R, Mattson J, Svahn BM, Ringden O, Winiarski J, Ljungman P, Dalianis T. 2008. BK-viruria and haemorrhagic cystitis are more frequent in allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients receiving full conditioning and unrelated-HLA-mismatched grafts. *Bone Marrow Transplant*, 41 (8):737-742.
- Gorczynska E, Turkiewicz D, Rybka K, Toporski J, Kalwak K, Dyla A, Szczyra Z, Chybicka A. 2005. Incidence, clinical outcome, and management of virus-induced hemorrhagic cystitis in children and adolescents after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11 (10):797-804.
- Gordon M. 1993. Human haemopoietic stem cell assays. *Blood Rev*, 7 (3):190-197.
- Graf Finckenstein F, Zabelina T, Dürken M, Dahlke J, Kröger N, Krüger W, Janka-Schaub G, Erttmann R, Zander AR, Kabisch H. 2002. [Unrelated donor stem cell transplantation in children: low toxicity using a GvHD-prophylaxis regimen with CSA, MTX, metronidazole, iv-immunoglobulin and ATG]. *Klin Padiatr*, 214 (4):206-211.

- Groth CG, Brent LB, Calne RY, Dausset JB, Good RA, Murray JE, Shumway NE, Schwartz RS, Starzl TE, Terasaki PI, Thomas ED, van Rood JJ. 2000. Historic landmarks in clinical transplantation: conclusions from the consensus conference at the University of California, Los Angeles. *World J Surg*, 24 (7):834-843.
- Hale G, Rochester R, Heslop H, Krance R, Gingrich J, Benaim E, Horwitz E, Cunningham J, Tong X, Srivastava D, Leung W, Woodard P, Bowman L, Handgretinger R. 2003. Hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation in children: clinical characteristics and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*, 9 (11):698-705.
- Hale GA, Heslop HE, Krance RA, Brenner MA, Jayawardene D, Srivastava DK, Patrick CC. 1999. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 23 (3):277-282.
- Hassan Z, Remberger M, Svenberg P, Elbänder M, Omazic B, Mattsson J, Conrad R, Svahn BM, Ahlgren A, Sairafi D, Aschan J, Le Blanc K, Barkholt L, Ringdén O. 2007. Hemorrhagic cystitis: a retrospective single-center survey. *Clin Transplant*, 21 (5):659-667.
- Hebart H, Brugger W, Grigoleit U, Gscheidle B, Loeffler J, Schäfer H, Kanz L, Einsele H, Sinzger C. 2001. Risk for cytomegalovirus disease in patients receiving polymerase chain reaction-based preemptive antiviral therapy after allogeneic stem cell transplantation depends on transplantation modality. *Blood*, 97 (7):2183-2185.
- Heining C, Spyridonidis A, Bernhardt E, Schulte-Mönting J, Behringer D, Gröllich C, Jakob A, Bertz H, Finke J. 2007. Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. *Bone Marrow Transplant*, 39 (10):613-622.
- Hirsch H. 2005a. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis*, 41 (3):354-360.
- Hirsch H. 2005b. Virus infections post transplant: risk and immunity. *Transpl Infect Dis*, 7 (3-4):97-98.
- Hirsch HH, Steiger J. 2003. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*, 3 (10):611-623.
- Hu RQ, Mehter H, Nadasdy T, Satoskar A, Spetie DN, Rovin BH, Hebert L. 2008. Severe hemorrhagic cystitis associated with prolonged oral cyclophosphamide therapy: case report and literature review. *Rheumatol Int*, 28 (11):1161-1164.
- Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. 1950. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med*, 35 (5):746-770.
- Jäger L. 1989. Transplantation. In: Jäger L. Hrsg. *Klinische Immunologie und Allergologie*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 357-409.

- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2002. Die Erkennung von Antigenen. In: Janeway CA, Hrsg. Immunologie. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, 98-198.
- Kasper C, Sayer HG. 2006. Indikation zur Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. In: Schmoll HJ, Höffken K, Hrsg. Kompendium Internistische Onkologie. Heidelberg: Springer Verlag, 2318-2332.
- Klein AK, Patel DD, Gooding ME, Sempowski GD, Chen BJ, Liu C, Kurtzberg J, Haynes BF, Chao NJ. 2001. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 7 (8):454-466.
- Kolb HJ. 2000. Transplantation von Knochenmark und Blutstammzellen. In: Wilmann W, Huhn D, Wilms K, Hrsg. Internistische Onkologie. Stuttgart New York: Thieme, 261-272.
- Kolb HJ. 2003. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. In: Classen M, Diehl V, Hrsg. Innere Medizin. München Jena: Urban & Fischer, 172-178.
- Kondo M, Kojima S, Kato K, Matsuyama T. 1998. Late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Bone Marrow Transplant*, 22 (10):995-998.
- Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, Wutzler P. 2006. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virol*, 78 (12):1588-1598.
- Lee GW, Lee JH, Choi SJ, Kim S, Seol M, Kim WK, Lee JS, Lee KH. 2003. Hemorrhagic cystitis following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Korean Med Sci*, 18 (2):191-195.
- Leung A, Yuen K, Kwong Y. 2005a. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant*, 36 (11):929-937.
- Leung A, Chan M, Kwong Y. 2005b. Genotyping of the noncoding control region of BK virus in patients with haemorrhagic cystitis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 35 (5):531-532.
- Leung A, Suen C, Lie A, Liang R, Yuen K, Kwong Y. 2001. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood*, 98 (6):1971-1978.
- Leung A, Chan M, Yuen K, Cheng V, Chan K, Wong C, Liang R, Lie A, Kwong Y. 2005c. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 40 (4):528-537.

- Leung AY, Wong AS, Chan GC, Yuen KY, Kwong YL. 2006. Urinary reactivation of polyoma BK virus but not adenovirus in paediatric and adolescent patients after haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 37 (6):621-623.
- Leung AY, Mak R, Lie AK, Yuen KY, Cheng VC, Liang R, Kwong YL. 2002. Clinicopathological features and risk factors of clinically overt haemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 29 (6):509-513.
- Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, Matthes-Martin S, Suda M, Preuner S, Futterknecht B, Lawitschka A, Peters C, Potschger U, Gadner H. 2003. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood*, 102 (3):1114-1120.
- Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*, 12 (1):197-201.
- Mannick JA, Lochte HL, Jr., Ashley CA, Thomas ED, Ferrebee JW. 1960. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood*, 15:255-266.
- Marchetti S, Graffeo R, Siddu A, Santangelo R, Ciotti M, Picardi A, Favalli C, Fadda G, Cattani P. 2007. BK virus DNA detection by real-time polymerase chain reaction in clinical specimens. *New Microbiol*, 30 (2):119-126.
- Marinelli K, Bagnarelli P, Gaffi G, Trappolini S, Leoni P, Paggi AM, Della Vittoria A, Scalise G, Varaldo PE, Menzo S. 2007. PCR real time assays for the early detection of BKV-DNA in immunocompromised patients. *New Microbiol*, 30 (3):275-278.
- Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. 1965. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res*, 25 (9):1525-1531.
- McCann S, Byrne JL, Rovira M, Shaw P, Ribaud P, Sica S, Volin L, Olavarria E, Mackinnon S, Trabasso P, VanLint MT, Ljungman P, Ward K, Browne P, Gratwohl A, Widmer AF, Cordonnier C. 2004. Outbreaks of infectious diseases in stem cell transplant units: a silent cause of death for patients and transplant programmes. *Bone Marrow Transplant*, 33 (5):519-529.
- McNees AL, White ZS, Zanwar P, Vilchez RA, Butel JS. 2005. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol*, 34 (1):52-62.
- Merlino C, Bergallo M, Gribaudo G, Gregori G, Paolo Segoloni G, Giacchino F, Ponzi AN, Cavallo R. 2003. Polyomavirus BK DNA quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *J Clin Virol*, 28 (3):265-274.



- Metcalf D. 2007a. On hematopoietic stem cell fate. *Immunity*, 26 (6):669-673.
- Metcalf D. 2007b. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells*, 25 (10):2390-2395.
- Miao R, Dougherty RM. 1977. Characterization of human papovavirus RFV: comparison with SV40 and BKV. *J Gen Virol*, 35 (1):67-75.
- Mitra DK, Singh HP, Singh M, Alwadi A, Kochupillai V, Raina V, Kumar L, Mehra NK. 2002. Reconstitution of naïve T cells and type 1 function after autologous peripheral stem cell transplantation: impact on the relapse of original cancer. *Transplantation*, 73 (8):1336-1339.
- Morais MM, Belarmino-Filho JN, Brito GA, Ribeiro RA. 1999. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. *Braz J Med Biol Res*, 32 (10):1211-1215.
- Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, Przepiorka D, Davies S, Petersen FB, Bartels P, Buell D, Fitzsimmons W, Anasetti C, Storb R, Ratanatharathorn V. 2000. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*, 96 (6):2062-2068.
- Ordemann R, Naumann R, Geissler G, Bornhauser M, Schuler U, Ehninger G. 2000. Encouraging results in the treatment of haemorrhagic cystitis with estrogen - report of 10 cases and review of the literature. *Bone Marrow Transplant*, 25 (9):981-985.
- Ottinger H, Grosse-Wilde M, Schmitz A, Grosse-Wilde H. 1994. Immunogenetic marrow donor search for 1012 patients: a retrospective analysis of strategies, outcome and costs. *Bone Marrow Transplant*, 14 Suppl 4:S34-38.
- Ottinger H, Ferencik S, Beelen D, Lindemann M, Peceny R, Elmaagacli A, Husing J, Grosse-Wilde H. 2003. Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors. *Blood*, 102 (3):1131-1137.
- Ozawa S, Nakaseko C, Nishimura M, Maruta A, Cho R, Ohwada C, Sakamaki H, Sao H, Mori S, Okamoto S, Miyamura K, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodaera Y. 2007. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor: incidence, risk factors and association with relapse. A report from the Japan Marrow Donor Program. *Br J Haematol*, 137 (2):142-151.

- Park SH, Choi SM, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Lee JW, Min WS, Shin WS, Kim CC. 2006. Current trends of infectious complications following hematopoietic stem cell transplantation in a single center. *J Korean Med Sci*, 21 (2):199-207.
- Parkmann R, Weinberg KI. 1999. Immunological Reconstruction Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Forman SJ Hrsg. *Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford London Edinburgh Carlton: Blackwell Science, Inc., 704-711.
- Parody R, Martino R, Rovira M, Vazquez L, Vázquez MJ, de la Cámara R, Blazquez C, Fernández-Avilés F, Carreras E, Salavert M, Jarque I, Martín C, Martínez F, López J, Torres A, Sierra J, Sanz GF. 2006. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12 (7):734-748.
- Peinemann F, de Villiers EM, Dörries K, Adams O, Vögeli TA, Burdach S. 2000. Clinical course and treatment of haemorrhagic cystitis associated with BK type of human polyomavirus in nine paediatric recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Eur J Pediatr*, 159 (3):182-188.
- Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. 2003. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol*, 26 (1):71-77.
- Provenzano M, Bracci L, Wyler S, Hudolin T, Sais G, Gosert R, Zajac P, Palu G, Heberer M, Hirsch HH, Spagnoli GC. 2006. Characterization of highly frequent epitope-specific CD45RA+/CCR7+/- T lymphocyte responses against p53-binding domains of the human polyomavirus BK large tumor antigen in HLA-A\*0201+ BKV-seropositive donors. *J Transl Med*, 4:47.
- Randhawa P, Ho A, Shapiro R, Vats A, Swalsky P, Finkelstein S, Uhrmacher J, Weck K. 2004. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol*, 42 (3):1176-1180.
- Rank A, 2007. Stammzelltransplantation. In: Possinger K, Regierer AC. Hrsg. *Facharzt Hämatologie Onkologie*. München Jena: Urban & Fischer, 183-208.
- Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus H, Fu J, Uberti J. 2001. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant*, 28 (2):121-129.

- Ringdén O, Barrett AJ, Zhang MJ, Loberiza FR, Bolwell BJ, Cairo MS, Gale RP, Hale GA, Litzow MR, Martino R, Russell JA, Tiberghien P, Urbano-Ispizua A, Horowitz MM. 2003. Decreased treatment failure in recipients of HLA-identical bone marrow or peripheral blood stem cell transplants with high CD34 cell doses. *Br J Haematol*, 121 (6):874-885.
- Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Mariotti A, Sica S, Sorà F, Chiusolo P, Scambia G, Rumi C, Leone G. 2001. Immune reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of interleukin-15 on T-cell survival and effector functions. *Exp Hematol*, 29 (12):1503-1516.
- Saavedra S, Jarque I, Sanz GF, Moscardó F, Jiménez C, Martín G, Plumé G, Regadera A, Martínez J, De La Rubia J, Acosta B, Pemán J, Pérez-Bellés C, Gobernado M, Sanz MA. 2002. Infectious complications in patients undergoing unrelated donor bone marrow transplantation: experience from a single institution. *Clin Microbiol Infect*, 8 (11):725-733.
- Sanders JE. 1990. Late effects in children receiving total body irradiation for bone marrow transplantation. *Radiother Oncol*, 18 Suppl 1:82-87.
- Sanders JE. 2008. Growth and development after hematopoietic cell transplant in children. *Bone Marrow Transplant*, 41 (2):223-227.
- Scheck O. 2006 Anwendung der LightCycler Technologie zur quantitativen Bestimmung viraler DNA bei immunsupprimierten Patienten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität
- Scheffold C, Berdel WE, Kienast J. 2004. Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation. *Die Onkologie Teil 1*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 536-562.
- Seber A, Shu XO, Defor T, Sencer S, Ramsay N. 1999. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. *Bone Marrow Transplant*, 23 (1):35-40.
- Socié G, Salooja N, Cohen A, Rovelli A, Carreras E, Locasciulli A, Korthof E, Weis J, Levy V, Tichelli A. 2003. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 101 (9):3373-3385.
- Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. 2003. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol*, 84 (Pt 6):1499-1504.
- Storb R. 1984. Bone marrow transplantation: Progress and Problems. *The Journal of Pediatrics*, 103:413-417.

- Strahm B, Locatelli F, Bader P, Ehlert K, Kremens B, Zintl F, Führer M, Stachel D, Sykora KW, Sedlacek P, Baumann I, Niemeyer CM. 2007. Reduced intensity conditioning in unrelated donor transplantation for refractory cytopenia in childhood. *Bone Marrow Transplant*, 40 (4):329-333.
- Sundsford A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. 1994. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol*, 32 (5):1390-1394.
- Sutherland JS, Spyroglou L, Muirhead JL, Heng TS, Prieto-Hinojosa A, Prince HM, Chidgey AP, Schwarzer AP, Boyd RL. 2008. Enhanced Immune System Regeneration in Humans Following Allogeneic or Autologous Hemopoietic Stem Cell Transplantation by Temporary Sex Steroid Blockade. *Clin Cancer Res*, 14 (4):1138-1149.
- Thomas ED. 1995. Knochenmarkstransplantation. *Harrisons Innere Medizin* 2. Berlin Wien: Blachwell Wiss.-Verlag.
- Thomas ED, Blume KG. 1999. Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 5 (6):341-346.
- Tsuboi K, Kishi K, Ohmachi K, Yasuda Y, Shimizu T, Inoue H, Matsumoto M, Hattori K, Yoshioka F, Watanabe S, Ogawa Y, Kawada H, Yabe H, Yabe M, Kato S, Hotta T. 2003. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 32 (9):903-907.
- Uderzo C, Pilon M, Corti P, Tridello G, Tana F, Zintl F, Nysom K, Galambrun C, Fagioli F, Varotto S, Messina C, Verdegner A, Urban C, Faraci M, Dini G, Fedeli S, Tichelli A, Rovelli A, Socié G. 2007. Impact of cumulative anthracycline dose, preparative regimen and chronic graft-versus-host disease on pulmonary and cardiac function in children 5 years after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation on behalf of the EBMT Pediatric Diseases and Late Effects Working Parties. *Bone Marrow Transplant*, 39 (11):667-675.
- Valcárcel D, Martino R, Sureda A, Canals C, Altés A, Briones J, Sanz MA, Parody R, Constans M, Vilella SL, Brunet S, Sierra J. 2005. Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol*, 74 (2):144-151.
- van Kraaij MG, Verdonck LF, Rozenberg-Arska M, Dekker AW. 2002. Early infections in adults undergoing matched related and matched unrelated/mismatched donor stem cell transplantation: a comparison of incidence. *Bone Marrow Transplant*, 30 (5):303-309.

- Vianelli N, Renga M, Azzi A, De Santis RD, Bandini G, Tosi P, Tura S. 2000. Sequential vidarabine infusion in the treatment of polyoma virus-associated acute haemorrhagic cystitis late after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 25 (3):319-320.
- Vögel TA, Peinemann F, Burdach S, Ackermann R. 1999. Urological treatment and clinical course of BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis in children after bone marrow transplantation. *Eur Urol*, 36 (3):252-257.
- Wade JC. 2006. Viral infections in patients with hematological malignancies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:368-374.
- Waller EK. 2007. Hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell trans-plantation: much progress and many remaining issues. *Chin Med J (Engl)*, 120 (19):1671.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, Niesters HG, Lawitschka A, Lion T. 2004. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol*, 42 (11):5189-5198.
- Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP. 2001. Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*, 39 (12):4357-4361.
- Wong A, Chan K, Cheng V, Yuen K, Kwong Y, Leung A. 2007a. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 44 (6):830-837.
- Wong ASY, Chan KH, Cheng VCC, Yuen KY, Kwong YL, Leung AYH. 2007b. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 44 (6):830-837.
- Xu LP, Zhang HY, Huang XJ, Liu KY, Liu DH, Han W, Chen H, Chen YH, Gao ZY, Zhang YC, Dao-Pei L. 2007. Hemorrhagic cystitis following hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and association with CMV reactivation and graft-versus-host disease. *Chinese Medical Journal*, 120 (19):1666-1671.
- Zaia JA. 1999. Cytomegalovirus Infection. In: Forman SJ, Hrsg. *Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford London Edinburgh Carlton: Blackwell Science, Inc., 560-583.

- Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T. 2007. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol*, 45 (1):193-198.
- Zintl F. 1988a. [Bone marrow transplantation in childhood. II]. *Kinderarztl Prax*, 56 (7):321-327.
- Zintl F. 1988b. [Bone marrow transplantation in childhood. I]. *Kinderarztl Prax*, 56 (6):259-264.
- Zintl F, Hermann J, Fuchs D, Prager J, Müller A, Reiners B, Füller J. 1991. [Correction of fatal genetic diseases using bone marrow transplantation. 1]. *Kinderarztl Prax*, 59 (1-2):6-9.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Remissionsstadien/Rezidiivstadien
Tabelle 2:	Anzahl Chemo- und Radiochemotherapie bei 165 durchgeführten HSZT
Tabelle 3:	Darmdekontamination
Tabelle 4:	Charakteristik der Transplantationsart
Tabelle 5:	Verwendete Stammzellquelle
Tabelle 6:	Verlaufscharakteristika
Tabelle 7:	Primersequenz der BKV-PCR
Tabelle 8:	Reagenzien zur Eluatherstellung
Tabelle 9:	Reagenzien zur qualitativen PCR und Agarose-Gelelektrophorese
Tabelle 10:	Reagenzien zur Q-PCR
Tabelle 11:	Geräte und Hilfsmittel
Tabelle 12:	Transplantationsart bei Prä- und Posttransplantationszystitis
Tabelle 13:	Absolute Häufigkeiten der Patienten mit und ohne HC in Bezug auf die Grenzwerte $10^7$ Kopien/ml
Tabelle 14:	Univariate Risikofaktorenanalyse
Tabelle 15:	Multivariate Risikofaktorenanalyse

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Häufigkeiten der Erkrankungen bei Ersttransplantation
- Abb. 2: Chemotherapeutikaverwendung bei allen 165 Transplantationen
- Abb. 3: Geschlecht der Spender bei allen allogenen Transplantationen
- Abb. 4: Gelelektrophorese der spezifischen BKV-PCR
- Abb. 5: Linear Regression und Crossing Points am Beispiel des Versuches 13 am 03.12.2007
- Abb. 6: Anzahl der BKV-Nachweise nach dem Geschlecht
- Abb. 7: Zeitpunkte und Anzahlen der Entwicklung der HC
- Abb. 8: Anzahl der verwendeten Stammzellquellen nach der Transplantationsart bei Posttransplantationszystitis
- Abb. 9: Mediane Viruslasten im Urin für Patienten mit und ohne HC
- Abb. 10: Mediane Viruslasten im Urin für Patienten ohne HC und mit HC-Grad 1-2 und HC-Grad 3-4
- Abb. 11: Mediane Viruslasten des Blutes nach den HC-Schweregraden
- Abb. 12: Mediane Viruslasten der Patienten mit und ohne HC nach dem Geschlecht
- Abb. 13: Mediane Viruslasten im Urin mit und ohne HC nach dem Alter
- Abb. 14: Mediane Viruslasten im Urin der Patienten mit und ohne HC nach der Konditionierungsart
- Abb. 15: Mediane Viruslasten der Patienten mit und ohne HC nach dem Chemotherapeutikum
- Abb. 16: Mediane Viruslasten im Urin der Patienten mit und ohne HC nach der ATG-Gabe
- Abb. 17: Mediane Viruslasten im Urin nach Transplantationsart und Grad der HC
- Abb. 18: Mediane Viruslasten im Urin in Bezug auf aGVHD- Patienten mit und ohne HC
- Abb. 19: Verlauf der Viruslasten im Urin und Blut von Patient 355
- Abb. 20: Verlauf der Viruslasten im Urin und Blut von Patient 451
- Abb. 21: Verlauf der Viruslasten im Urin von Patient 403
- Abb. 22: Verlauf der Viruslasten im Urin von Patient 442



### 9.3 Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Loreen Maier
Geburtsdatum:	5. August 1983
Geburtsort:	Bad Langensalza
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
1990-1994	Albert Schweitzer Grundschule Thamsbrück
1994-2002	Friedrich-Ludwig-Jahn-Gymnasium Grossengottern
2002	Abitur
2002-2003	Tätigkeit als Au-Pair in Boston, MA, USA Collage: “American Government” am Quincy Collage; Quincy, MA, USA “Aquarelle Painting” an der School of Art, Cohasset, MA, USA
2003-lfd.	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2008-lfd.	Praktisches Jahr

Jena, 12.09.2008

Loreen Maier

#### 9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr PD Dr. med. B. Gruhn, Frau Dr. rer. nat. R. Egerer, Frau Dipl.-Math. A. Brandstädt,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 12.09.2008

Loreen Maier

## 9.5 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei **Herrn PD Dr. med. habil. Bernd Gruhn** für die Überlassung des Themas und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten, eine Doktorarbeit schreiben zu können, bedanken. Seine engagierte Betreuung und seine unermüdlichen Motivationshilfen haben einen großen Einfluss auf den Entstehungsprozess der Dissertation gehabt.

Dank gilt **Frau Dr. rer. nat. Renate Egerer** von Institut für Virologie und Antivirale Therapie und **Frau MTA H.-H. Fischer**, die mich bei der Durchführung der Light Cycler® PCR tatkräftig unterstützten.

Bei **Frau Dipl.-Math. Antje Brandstädt** vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation möchte ich mich für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Besonderer Dank gilt **Enrico Hoffmann** der trotz meiner rudimentären PC-Kenntnisse nicht den Glauben daran verloren hat, dass Tabellen, Diagramme usw. die Form erhalten, die ihnen gebührt.

**Sigrid Hoffmann, Friedrike Langlotz** und **Marianne Großmann** möchte ich für ihre Unterstützung ganz herzlich danken.

**Meiner Familie** und **Mario** und allen, die eigentlich nicht genannt werden wollten, möchte ich danken, dass sie die ganze Zeit an mich geglaubt haben, mich in schwierigen Phasen ertragen und mich immer wieder an meine Fähigkeiten erinnert haben.